



Technische Universität München

TUM School of Life Sciences

Genübertragung zur Etablierung neuer Bazillen für die sekretorische Produktion heterologer Glycosidhydrolasen

Simon Heinze

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ralph Hückelhoven

Prüfende der Dissertation: 1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl

2. apl. Prof. Dr. Matthias A. Ehrmann

Die Dissertation wurde am 11.11.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 01.02.2021 angenommen.

DANKSAGUNG

Bei der Erstellung dieser Arbeit durfte ich auf die Unterstützung vieler Personen zählen. Daher richtet sich mein herzlicher Dank an ...

... meinen Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Liebl, für die Möglichkeit, dieses Projekt am Lehrstuhl für Mikrobiologie durchführen zu dürfen, für fachlichen und strategischen Rat und für sein offenes Ohr.

... Dr. Wolfgang Schwarz und Dr. Vladimir Zverlov, für Diskussionen rund um große und kleine Fragen, sowie das besonders produktive Umfeld in der AG Schwarz/Zverlov.

... Dr. Petra Kornberger, für das kompetente Management des GERUS-Projekts und die gute Zusammenarbeit in Theorie und Praxis.

... meine Kollegen Jonathan Herlet, Dr. Jannis Bröker, Dr. Mathias Mechelke, Dr. Björn Andreeßen, Dr. Benedikt Leis, Dr. Claudia Held, Dr. Daniela Köck, Patricia Krähe, Dr. Waldemar Hauf, Dr. Georg Schmid, Sabrina Sigl, Dr. Sigrid Graubner, Regina Rettenmaier und Melanie Baudrexel sowie allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls, für die sehr gute Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und den regen Austausch.

... meinen Studenten, Kerstin Zimmermann, Christian Grätz, Lisa Bock, Claudia Schuler und Wenzel Manlik, die in Form ihrer Abschluss- oder Praktikumsarbeiten wertvolle Beiträge zu meinen Ergebnissen geliefert haben.

... Prof. Dr. Volker Sieber und Christoph Schilling (Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe, TUM), für pCasPP-Plasmide und Informationen rund um die Exopolysaccharide von *P. polymyxa*.

... Dr. Joachim Venus und Roland Schneider (Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V., Potsdam), für die Milchsäurebakterien.

... an unsere Kooperationspartner im Rahmen des GERUS-Projekts, Prof. Dr. Arkady Sinitsyn und Alexandra Rojkova (Institution of Russian Academy of Sciences, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Moskau) für den wissenschaftlichen und kulturellen Austausch.

... das BMBF, für Förderung im Rahmen des Förderprogramms BioÖkonomie International, Förderkennzeichen: 031A555.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch ganz besonders bei meiner Familie bedanken. Josy, Danke, dass du mir insbesondere auch in der Zeit nach der praktischen Arbeit am Lehrstuhl den Rücken für das Schreiben freigehalten hast.

ZUSAMMENFASSUNG

Enzyme sind als Katalysatoren chemischer Reaktionen ein essenzieller Bestandteil biotechnologischer Anwendungen und generieren jährlich Umsätze in Milliardenhöhe. Um sie effizient herzustellen, werden Expressionssysteme eingesetzt, bei denen der Wirtsorganismus das Enzym in das Kulturmedium sekretiert. Während so die Gewinnung wirtseigener Enzyme, wie beispielsweise Waschmittelproteasen aus *Bacillus subtilis*, kostengünstig im industriellen Maßstab möglich ist, bleibt die Leistungsfähigkeit der etablierten Produktionsstämme für die Produktion heterologer Enzyme limitiert.

In dieser Arbeit wurden Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Produktionsorganismen für die Herstellung heterologer Enzyme, wie z. B. Glycosidhydrolasen, ausgelotet. Es wurde das Expressionsplasmid pBACOV entwickelt, das ein breites Wirtsspektrum aufweist. pBACOV konnte per triparentaler Konjugation leicht in 12 verschiedene Spezies der Gattungen *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus* und *Lactococcus* übertragen werden, ohne dass eine spezielle Anpassung der Transkonjugationsmethode an die verschiedenen Empfängerbakterien notwendig war. Somit wurde ein vielseitiges gentechnisches Werkzeug entwickelt, das die Anwendung rekombinanter DNA und die Expression heterologer Gene in neuen und etablierten, Bakterien der Klasse *Bacilli* ermöglicht. Um die Anwendbarkeit von pBACOV zur Etablierung neuer Bazillen für die sekretorische Enzymproduktion zu zeigen, wurde die Herstellung heterologer Glycosidhydrolasen aus dem thermophilen Anaerobier *Hungateiclostridium thermocellum* in *Paenibacillus polymyxa* untersucht und optimiert. Die erfolgreiche Sekretion der Zielenzyme Cel8A, Cel9D, Cel9R und Xgh74A durch *P. polymyxa* konnte gezeigt werden. Um die Produktionsleistung zu verbessern, wurden für alle vier Zielgene Signalpeptid-Bibliotheken durchmustert und gut geeignete Signalpeptide identifiziert. Angereichertes, heterolog hergestelltes Cel8A war aktiv auf Carboxymethylcellulose und Gersten- β -Glucan und bildete Cohesin-Dockerin-Komplexe mit CipA6.2, einem rekombinanten, cellulosomalalen Scaffoldprotein mit sechs Cohesindomänen. Zur Steigerung der Cel8A-Sekretion wurden zusätzlich der Promotor und das Kulturmedium optimiert. Eine Strategie war die Identifizierung stark sekretierter Wirtsproteine per Massenspektrometrie, deren Promotoren sich auch als effiziente Promotoren für die heterologe Genexpression in *P. polymyxa* erwiesen. Auch die Koexpression von Chaperon-Genen war erfolgreich, führte jedoch zu keiner weiteren

Effizienzsteigerung. Mit diesen Ansätzen konnte eine Gesamtsteigerung der Cel8A-Aktivität im Überstand von *P. polymyxa* von ursprünglich etwa 30 U/l auf 5.475 ± 411 U/l (ca. 0,35 g/l) erzielt werden.

ABSTRACT

Enzymes are an essential part of biotechnological applications as catalysts of chemical reactions and generate annual sales of several billions of dollars. To produce enzymes efficiently, expression systems are used in which the host organism secretes the target enzyme into the growth medium. While this enables the cost-efficient, industrial-scale production of native enzymes, like *Bacillus subtilis* proteases for detergents, the capability of established strains for the production of heterologous enzymes is still limited.

In this thesis, possibilities were evaluated for the development of new production organisms for the production of heterologous enzymes, such as glycoside hydrolases. The broad host range expression plasmid pBACOV was developed. pBACOV can easily be transferred to 12 different bacterial species of the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus* and *Lactococcus* by triparental conjugation, without the need for recipient-specific adaptations of the transconjugation protocol. Thus, a versatile genetic tool was developed, enabling the application of recombinant DNA technologies and expression of heterologous genes in new and established bacteria of the class *Bacilli*. To show the applicability of pBACOV to establish new bacilli as hosts for secretory enzyme production, the production of heterologous glycoside hydrolases from the thermophilic anaerobic bacterium *Hungateiclostridium thermocellum* in *Paenibacillus polymyxa* was examined and optimized in the second part of this work. The successful secretion of the target enzymes Cel8A, Cel9D, Cel9R and Xgh74A by *P. polymyxa* was demonstrated. To improve the production performance, signal peptide libraries were screened for all four target genes and well suited signal peptides were identified. Heterologously produced, purified Cel8A was active against carboxymethyl cellulose and barley β -glucan and formed cohesin-dockerin complexes with CipA6.2, a recombinant, cellulosomal scaffold protein with six cohesin domains. To further increase Cel8A secretion, the gene's promoter and the culture medium were optimized. One strategy followed was the identification of strongly secreted host proteins by mass spectrometry, whose promoters proved to be new and efficient promoters for heterologous gene expression in *P. polymyxa*. The coexpression of chaperone genes was also successful, but did not result in a further increase of production efficiency. Using these approaches, an increase of the Cel8A activity in the supernatant of *P. polymyxa* from initially 30 U/l to $5,475 \pm 411$ U/l (about 0.35 g/l) was achieved.

PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE

Publikationen und Konferenzbeiträge im Rahmen dieser Arbeit:

Heinze, S., Kornberger, P., Grätz, C., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., Liebl, W., 2018a. Transmating: conjugative transfer of a new broad host range expression vector to various *Bacillus* species using a single protocol. BMC Microbiol. 18, 56.

Heinze, S., Zimmermann, K., Ludwig, C., Heinzlmeir, S., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., Liebl, W., Kornberger, P., 2018b. Evaluation of promoter sequences for the secretory production of a *Clostridium thermocellum* cellulase in *Paenibacillus polymyxa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 10147-10159.

Heinze, S., Lagkouvardos, I., Liebl, W., Schwarz, W.H., Kornberger, P., Zverlov, V. V., 2020. Draft Genome Sequence of *Paenibacillus polymyxa* DSM 292, a Gram-Positive, Spore-Forming Soil Bacterium with High Biotechnological Potential. Microbiol. Resour. Announc. 9. <https://doi.org/10.1128/mra.00071-20>

Heinze, S., Kornberger, P., Rojkova, A., Sinitsyn, A., Zverlov, V. V., Ehrenreich, A., Liebl, W., Schwarz, W. H. (2016) Development of new expression strains for secretory production of heterologous cellulases. Poster auf der EcoBio 2016 Konferenz in Rotterdam, NL

Weitere Publikationen und Konferenzbeiträge:

Heinze, S., Mechelke, M., Kornberger, P., Liebl, W., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., 2017. Identification of endoxylanase XynE from *Clostridium thermocellum* as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. *Sci. Rep.* 7, 11178.

Leis, B., **Heinze, S.**, Angelov, A., Pham, V.T.T., Thürmer, A., Jebbar, M., Golyshin, P.N., Streit, W.R., Daniel, R., Liebl, W., 2015. Functional Screening of Hydrolytic Activities Reveals an Extremely Thermostable Cellulase from a Deep-Sea Archaeon. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 95.

Heinze, S., Mechelke, M., Kornberger, P., Liebl, W., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V. (2017). XynE from *Clostridium thermocellum* is the first xylanase of the new glycoside hydrolase family GH141. Poster auf dem Bio World Congress on Industrial Biotechnology 2017 in Montréal, CA

INHALT

Danksagung	i
Zusammenfassung	i
Abstract	iii
Publikationen und Konferenzbeiträge	v
Inhalt	vii
Abkürzungsverzeichnis	xi
1. Einleitung	15
1.1 Sekretorische Proteinproduktion mit Bazillen	15
1.1.1 Enzyme in der industriellen Biotechnologie	15
1.1.2 Der Sec-Mechanismus	17
1.2 Heterologe Enzyme & die Notwendigkeit neuer Expressionsstämme	20
1.2.1 Das Cellulosom und Cellulasen von <i>Hungateiclostridium thermocellum</i>	20
1.2.2 Probleme bei der sekretorischen Produktion heterologer Enzyme	23
1.3 Genübertragung in Bakterien	26
1.4 Ziel dieser Arbeit	28
2. Material & Methoden	31
2.1 Kits und Geräte	31
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel	35
2.3 Nährmedien, Puffer und Lösungen	44
2.4 Bakterienstämme und Plasmide	49
2.5 Mikrobiologische Methoden	54
2.5.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> und Bazillen	54
2.5.2 Kultivierung von milchsäurebildenden Bakterien	55

2.5.3	Kryokonservierung	56
2.5.4	Techniken zur Replikation von Kolonien auf frische Agarplatten	56
2.5.5	Photometrische Messung des Wachstums sowie der Zelldichte	57
2.5.6	Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Kanamycin und Polymyxin B	57
2.5.7	Nachweis extrazellulärer Wirtshydrolasen mittels Indikatormedien.....	59
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	60
2.6.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	60
2.6.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	60
2.6.3	Präparative und analytische Polymerasekettenreaktion (PCR)	61
2.6.4	Präparative und analytische Agarosegelelektrophorese	63
2.6.5	Linearisierung von pBACOV für die Klonierung	64
2.6.6	Insertion von Zielgenen mittels Ligierung.....	65
2.6.7	Klonierung mittels Gibson Assembly.....	66
2.6.8	Erstellen von SP-Bibliotheken mittels In-Fusion Assembly	67
2.6.9	Klonierung von CRISPR/Cas9-Plasmiden mittels Golden Gate Assembly	68
2.6.10	Quikchange-Mutagenese	71
2.6.11	Isolierung von Plasmid-DNA	73
2.6.12	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten.....	73
2.6.13	Isolierung genomischer DNA	73
2.6.14	Sequenzierung von genomischer DNA.....	74
2.6.15	Plasmidtransfer in Gram-positive Akzeptorstämme mittels triparentaler Konjugation	74
2.6.16	Erzeugung gezielter Gendelektionen mittels CRISPR/Cas9	77

2.7	Proteinchemische Methoden	78
2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode.....	78
2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Extinktion	78
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)	79
2.7.4	Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot	81
2.7.5	Expression von <i>sfGFP</i> und Bestimmung der relativen <i>sfGFP</i> - Fluoreszenz	82
2.7.6	Bestimmung der β -Glycosidaseaktivität in Kulturüberständen und gereinigten Enzympräparaten mittels DNSA	83
2.7.7	Bestimmung der CMCCase-Aktivität in Kulturüberständen mittels Azo- CMC	84
2.7.8	Komplexierung von Cel8A und CipA6.2	85
2.8	Sekretomanalyse mittels quantitativer LC-MS/MS.....	87
2.9	Enzymproduktion im Bioreaktor	89
3.	Ergebnisse	91
3.1	Genübertragung in Vertreter der Klasse Bacilli	91
3.1.1	Vorüberlegungen zur Konstruktion eines neuen Expressionsplasmides mit breiter Anwendbarkeit in Bazillen.....	91
3.1.2	pBACOV, ein mobilisierbarer <i>Shuttle</i> -Vektor für konjugative Genübertragung	94
3.1.3	Auswahl geeigneter Bazillen als Empfängerorganismen	98
3.1.4	Konjugative Übertragung von pBACOV- <i>sfGFP</i>	102
3.2	<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 292 als neuer Wirt für die sekretorische Produktion heterologer Glycosidhydrolasen	109

3.2.1	Auswahl eines Kandidaten für die Entwicklung als neuer Produktionswirt.....	109
3.2.2	Machbarkeitsnachweis: sekretorische Produktion von Cel8A	112
3.2.3	Identifikation geeigneter Signalpeptide	115
3.2.4	Reinigung und Charakterisierung von Cel8A.....	135
3.2.5	Koexpression von Chaperongenem	141
3.2.6	Optimierung des Kulturmediums.....	144
3.2.7	Produktionssteigerung durch alternative Promotoren.....	147
3.2.8	Enzymproduktion im Bioreaktor	159
3.2.9	Gezielte Gendelektion.....	163
4.	Diskussion.....	171
4.1	Übertragung von pBACOV in Bazillen.....	171
4.2	<i>P. polymyxa</i> DSM 292 als neuer Wirt für die sekretorische Produktion heterologer Cellulasen	177
4.2.1	Auswahl von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 und Machbarkeitsnachweis	177
4.2.2	Optimierung der Produktivität	178
4.3	Ausblick.....	193
	Literaturverzeichnis	195
	Anhänge	CCXI
A1	Referenzkurve für den Azo-CMC-Test	CCXI
A2	Berechnungen zur Abdeckung aller SPs in einer Bibliothek	CCXIII
A3	Berechnungen mittels CasOT zur Auswahl der sgRNAs	CCXIV
	Eidesstattliche Erklärung	CCXVII
	Lebenslauf	CCXVIII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BBG	Barley- β -Glucan (β -Glucan aus Gerste)
BBGase	Barley- β -Glucanase
bp	Basenpaar(e)
CBM	Carbohydrate Binding Module
CMC	Carboxymethylcellulose
CMCase	Carboxymethylcellulase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNSA	3,5-Dinitrosalicylsäure
E_x	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
FPLC	Fast-Protein Liquid Chromatography
fw	forward (bei Primern)
GH	Glycosidhydrolase (Familie)
<i>His₆-tag</i>	Hexahistidin-Affinitäts- <i>tag</i>
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
Kan	Kanamycin
nt	Nucleotid(e)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PASC	Phosphoric Acid Swollen Cellulose
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pol	Polymyxin B
rbs	Ribosombindestelle
rv	reverse (bei Primern)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SP	Signalpeptid

SPase	Signalpeptidase
TAT	Twin-Arginin-Translocation
XG	Xyloglucan
XGase	Xyloglucanase

“Analysis of mixed cultures of nutritional mutants has revealed the presence of new types which strongly suggest the occurrence of a sexual process in the bacterium, Escherichia coli.”

— J. Lederberg & E. L. Tatum

“Gene Recombination in Escherichia coli”, Nature, 1946

1. EINLEITUNG

1.1 Sekretorische Proteinproduktion mit Bazillen

1.1.1 Enzyme in der industriellen Biotechnologie

Die industrielle Biotechnologie ermöglicht die umweltfreundliche, schnelle und kostengünstige Produktion von Chemikalien und Biokraftstoffen sowie von pharmazeutischen Produkten und Lebensmitteln. Aus diesem Grund verzeichnet die Branche ein starkes wirtschaftliches Wachstum (Ahmann & Dorgan, 2007; Chapman et al., 2018). Dabei nehmen Enzyme eine Schlüsselrolle ein. Der Markt für Enzyme belief sich 2016 allein in den vier Schlüsselbereichen Lebensmittel, Futtermittel, Waschmittel und technische Enzyme auf über 5 Milliarden US-Dollar und bis 2021 wird ein Wachstum von ca. 25 % prognostiziert (Abbildung 1, Chapman et al., 2018).

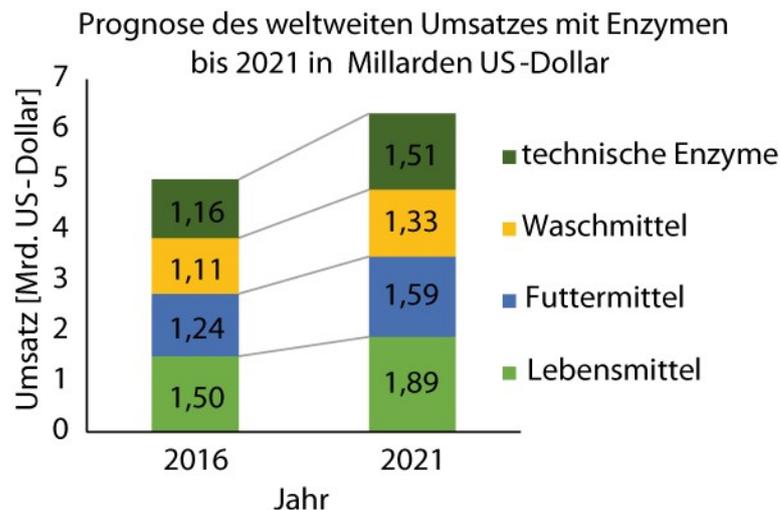


Abbildung 1: Weltweiter Umsatz mit Enzymen im Jahr 2016 und Prognose bis 2021 in US-Dollar. Abbildung adaptiert aus Chapman et al. (2018).

In diesen Schlüsselbereichen, aber auch in der pharmazeutischen Industrie, werden die Vorteile von enzymkatalysierten Prozessen schon erfolgreich eingesetzt. Dazu gehören beispielsweise der Einsatz der Penicillin-Acylase in der Antibiotikaproduktion, die

Produktion von Maissirup mit hohem Fructoseanteil (*high fructose corn syrup*) durch Glucose-Isomerase oder die Verwendung von Proteasen, Amylasen und Lipasen als Fleckentferner in Waschmitteln (Chapman et al., 2018).

Zur Produktion dieser Enzyme werden seit Jahrzehnten verschiedene Gram-positive Bakterienarten der Gattung *Bacillus* eingesetzt (Harwood, 1992). Diese Bodenbakterien sind in der Natur darauf angewiesen, Pflanzenreste wie Proteine, Stärke oder Cellulose als Nährstoffquelle verwerten zu können (Pohl & Harwood, 2010). Da eine Aufnahme dieser Makromoleküle ins Zellinnere nicht möglich ist, sekretieren Bazillen eine große Bandbreite an Hydrolasen in ihre Umgebung (Pohl & Harwood, 2010), die das Substrat extrazellulär in kleinere Bausteine wie Oligo- und Monosaccharide, oder Peptide und Aminosäuren aufspalten. Diese verkleinerten Moleküle können dann einfach von der Zelle aufgenommen und verstoffwechselt werden. Unter Idealbedingungen können Bazillen Enzyme in großen Mengen von bis zu 20 g/l in das Wachstumsmedium sekretieren (Schallmeyer et al., 2004). Dieser Tatsache verdanken sie ihren Erfolg in der industriellen Biotechnologie. Die Zielproteine können dadurch einfach und wirtschaftlich aus dem Kulturüberstand isoliert werden, ohne dass die Zellen aufgeschlossen und danach die Enzyme aus dem komplexen Gemisch zellulärer Biopolymere aufgereinigt werden müssen. So werden die Produktionskosten signifikant gesenkt (Freudl, 2018).

Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* und eine Reihe anderer *Bacillus*-Spezies werden in der Industrie am häufigsten eingesetzt. Diese Stämme werden hauptsächlich zur Überexpression von *Bacillus*-Genen eingesetzt, um beispielsweise Waschmittelenzyme herzustellen (Heinze et al., 2018a; Küppers et al., 2014; Schallmeyer et al., 2004). Während die sekretorische Produktion von wirtseigenen Proteinen bereits im industriellen Maßstab erfolgreich ist, gestaltet sich die Sekretion heterologer Proteine deutlich schwieriger und ineffizienter (Bien et al., 2014; Li et al., 2004; Pohl et al., 2013; Westers et al., 2004). Da die Ausbeuten bei der sekretorischen Produktion heterologer Enzyme sehr niedrig sind, werden neue Produktionsstämme aus anderen Gattungen und Arten für die Optimierung der Produktion neuer Enzyme benötigt (Küppers et al., 2014). So rücken aktuell neue Bakterienarten in den Fokus des Interesses. Spezies wie

Lactococcus lactis, *Streptomyces lividans* oder *Corynebacterium glutamicum* können heterologe Proteine sekretieren, welche sich beispielsweise nicht effizient mit *B. subtilis* exprimieren lassen (Freudl, 2018). Im Folgenden werden die molekularen Vorgänge der Proteinsekretion bei Bazillen und anderen Gram-positiven Bakterien beschrieben, bei denen die Translokation der Polypeptidkette über die Cytoplasmamembran (Export) gleichzeitig weitgehend dem Transport ins extrazelluläre Milieu entspricht. Bei Gram-negativen Bakterien, die eine äußere Membran als Bestandteil ihrer Zellwand besitzen, haben sich im Laufe der Evolution diverse unterschiedliche Mechanismen für die Überwindung dieser zusätzlichen Barriere während der Proteinsekretion entwickelt (Typ I – Typ IX Sekretionssysteme). Auf Proteinsekretion über die äußere Membran bei Gram-negativen Bakterien wird an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen.

1.1.2 Der Sec-Mechanismus

In Bakterien existieren zwei Mechanismen, um Proteine durch die Cytoplasmamembran nach außen zu schleusen: Sec (*general secretory*) und TAT (*twin-arginine translocation*). Die meisten Proteine werden über den Sec-Mechanismus exportiert und erst nach der Translokation in der extrazytoplasmatischen Umgebung gefaltet. Der TAT-Mechanismus kommt seltener zum Einsatz, und zwar immer dann, wenn ein Protein in vollständig gefalteter Form sekretiert werden muss (Pohl & Harwood, 2010). Der Sec-Mechanismus ist deutlich besser erforscht, weswegen die sekretorische Produktion heterologer Proteine in Bazillen in der Regel über diesen Weg abläuft (Pohl & Harwood, 2010).

Die Proteinsekretion über den Sec-Mechanismus ist in Abbildung 2 dargestellt. Das zentrale Element der Sekretionsmaschinerie sind der Transmembrankanal SecYEG, durch welchen die Proteine die Membran passieren, und die Translocase SecA. SecA erkennt sekretorische Proteine mit hoher Affinität und ermöglicht ihren Transport durch SecYEG (Tsirigotaki et al., 2017). Zu Beginn des Sekretionsprozesses werden Proteine, die sekretiert werden sollen, im Cytoplasma identifiziert. Um dies zu ermöglichen, werden sekretorische Proteine als Prä-Proteine mit einem Signalpeptid (SP) translatiert. Das SP befindet sich am N-Terminus eines sekretorischen Proteins und wird während oder am Ende des Exportvorgangs abgespalten (Pohl & Harwood, 2010). Die SPs für die

Sekretion mittels des Sec-Mechanismus haben eine mittlere Länge von 20 – 30 Aminosäuren (AS) und einen definierten Aufbau. Am N-Terminus befindet sich die positiv geladene N-Region (Länge ca. 6 AS), gefolgt von der hydrophoben H-Region (10-18 AS). Das Ende eines SP bildet die C-Region, welche die Erkennungssequenz AXAA (X: beliebige AS) für die Signalpeptidase (SPase) enthält (Harwood & Cranenburgh, 2008; Pohl & Harwood, 2010). Damit ein Protein über den Sec-Mechanismus sekretiert werden kann, darf es nicht bereits im Cytoplasma zu seiner finalen Struktur falten. Um dies zu gewährleisten und das Prä-Protein zum SecYEG-Kanal zu transportieren, existieren co-translationale und post-translationale Mechanismen. Beim co-translationalen Mechanismus erkennt der *signal recognition particle* SRP das SP am N-Terminus der naszierenden Polypeptidkette direkt am Ribosom. SRP bindet das Prä-Protein, stabilisiert dessen ungefaltete Konformation und führt es zur Membran, wo der Komplex aus SRP, dem naszierenden Prä-Protein und dem Ribosom vom Rezeptor FtsY erkannt wird. Der Komplex bindet dann an den SecYEG-Kanal und das neu gebildete Protein wird noch während der Translation sekretiert (Tsirigotaki et al., 2017). Beim post-translationalen Weg wird das Prä-Protein zunächst vollständig im Cytosol translatiert. Anschließend wird es von SecA erkannt und zum SecYEG-Kanal geleitet. Chaperone können dabei unterstützen, das Prä-Protein in ungefalteter Form und somit exportkompetent zu halten (Harwood & Cranenburgh, 2008; Tsirigotaki et al., 2017). Nach der Ankunft des Prä-Proteins am SecYEG-Kanal erfolgt die Translokation. Dabei wird das Prä-Protein mit dem N-Terminus voran durch den Transmembrankanal transportiert. Dieser Prozess wird durch die protonenmotorische Kraft und den ATPase-Motor von SecA angetrieben (Tsirigotaki et al., 2017). Auf der extrazellulären Seite der Cytoplasmamembran wird nun das SP vom Prä-Protein durch Signalpeptidasen abgespalten. Die Spaltung erfolgt nach der Erkennungssequenz mit dem Consensus AXA. Nun kann das sekretierte Protein zu seiner nativen Tertiär- oder Quartärstruktur falten. Der Faltungsprozess selbst kann wiederum durch mehrere intrinsische und extrinsische Faktoren unterstützt werden, z.B. durch das Prä-Protein selbst, durch Peptidyl-prolyl-*cis/trans* Isomerasen (PrsA), Disulfid-Isomerasen oder auch zweiwertige Metallionen (Pohl & Harwood, 2010).

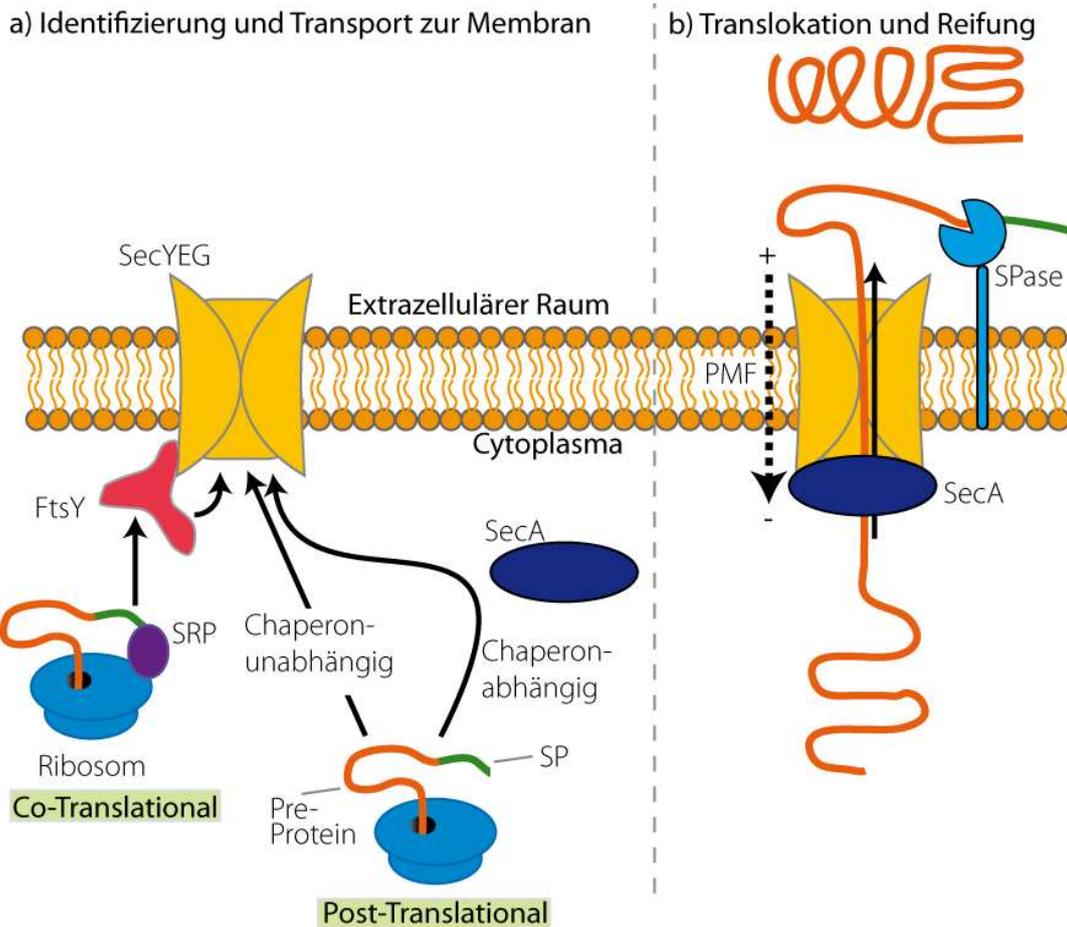


Abbildung 2: Proteinexport mittels des Sec-Mechanismus. Zuerst werden sekretorische Proteine identifiziert und zur Membran transportiert (a). Das ungefaltene Prä-Protein (orange) mit SP (grün) kann post-translational zum SecYEG-Transmembrankanale (gelb) wandern. Dabei wird die ungefaltete, sekretionsfähige Konformation entweder Chaperon-unabhängig oder Chaperon-abhängig aufrechterhalten. Das Prä-Protein wird von cytoplasmatischem oder SecYEG-assoziiertem SecA (dunkelblau) gebunden. Alternativ kann das Prä-Protein auch co-translational für die Sekretion vorbereitet werden. Dabei wird das SP der naszierenden Polypeptidkette direkt am Ribosom durch den *signal recognition particle* (SRP, violett) erkannt und gebunden. FtsY (hellrot) fungiert als Membran-Rezeptor für SRP und bewirkt die Anlagerung des Ribosom-Prä-Protein-SRP-Komplexes an SecYEG, sodass die naszierende Polypeptidkette direkt in SecYEG „hineinsynthetisiert“ wird. Der zweite Schritt im Sekretionsprozess ist die Translokation und Reifung (b). Die notwendige Energie für den chemo-mechanischen Transfer wird einerseits durch die protonenmotorischen Kraft (PMF) und andererseits durch den ATPase-Motor von SecA zur Verfügung gestellt. Auf der extrazellulären Seite der Cytoplasmamembran wird das SP durch membranassoziierte Signalpeptidasen (hellblau) vom Prä-Protein abgespalten, sodass das Protein zu seiner nativen Konformation falten kann. Abbildung modifiziert erstellt nach Tsirigotaki et al. (2017).

1.2 Heterologe Enzyme & die Notwendigkeit neuer Expressionsstämme

1.2.1 Das Cellulosom und Cellulasen von *Hungateiclostridium thermocellum*

Während Enzyme in der Pharma- und Lebensmittelbranche bereits eine wichtige Rolle spielen, müssen sie ihre Wettbewerbsfähigkeit z.B. bei der Produktion von Biokraftstoffen noch unter Beweis stellen (Chapman et al., 2018). Bei der Herstellung von Biokraftstoffen aus Biomasse kommen Cellulasen und Hemicellulasen zum Einsatz, die die pflanzlichen Polysaccharide in vergärbare Zucker aufspalten und so eine zentrale Rolle bei der effizienten Umwandlung der Pflanzenreste zu Biokraftstoffen spielen (Heinze et al., 2017). Allerdings wird der hohe Enzympreis als ein Hauptproblem auf dem Weg zur wirtschaftlich erfolgreichen Biokraftstoffproduktion aus lignocellulosehaltiger Biomasse angesehen (Ensinas et al., 2013). Um den Kostenbeitrag durch Enzyme zu senken, gibt es zwei grundsätzliche Möglichkeiten. Einerseits können die Produktionskosten durch ergiebige, sekretorische Produktionssysteme gesenkt werden. Zum anderen kann die benötigte Menge an Enzymen verringert werden, in dem man effizientere Enzyme oder Enzymkomplexe einsetzt.

Ein Beispiel für einen solchen Enzymkomplex ist das Cellulosom von *Hungateiclostridium thermocellum* (Basionym: *Clostridium thermocellum*, Viljoen et al., 1926; Zhang et al., 2018, *approved list* 1980, Skerman et al., 1980). Es ist einer der effizientesten bekannten Cellulasekomplexe (Leis et al., 2017) und macht das thermophile, anaerobe Bakterium *H. thermocellum* zu einem Spezialisten im Abbau pflanzlicher Biomasse: *H. thermocellum* ist der Organismus mit der höchsten Wachstumsrate auf kristalliner Cellulose (Zverlov et al., 2005a). Da die Cellulosomen sowohl an das Substrat als auch an die Zelloberfläche gebunden sind, bilden sie eine Verbindung zwischen Zelle und Substrat, was die Aufnahme der Hydrolyseprodukte vereinfacht und somit die Verfügbarkeit von Nährstoffen erhöht (Schwarz, 2001).

Das Cellulosom ist ein extrazellulärer Proteinkomplex, bestehend aus einzelnen

Enzymen, die über Cohesin-Dockerin Typ I Interaktionen an das nicht katalytische Scaffoldin-Rückgrat CipA andocken. Dadurch werden die einzelnen Enzyme und ihre individuellen Aktivitäten in räumliche Nähe zueinander gebracht. Dies fördert die Zusammenarbeit von Enzymen mit unterschiedlichen Reaktionsmechanismen und Substraten, sodass pflanzliche Polysaccharide effizient zu löslichen Zuckern abgebaut werden (Schwarz, 2001). Die katalytische Effizienz kann verstärkt werden, indem die Enzyme über zusätzliche *carbohydrate binding modules* (CBM) an das hochmolekulare Substrat anbinden. Durch seine hohe Aktivität und seinen modularen Aufbau besteht großes Interesse an der Anwendung von Cellulosomen und maßgeschneiderten Designer-Cellulosomen für den effizienten Abbau von lignocellulosehaltiger Biomasse für die Produktion von Biokraftstoffen und Chemikalien (Bayer et al., 2007; Leis et al., 2017).

Enzyme, die Polysaccharide abbauen, werden in der CAZy-Datenbank (CAZy = *carbohydrate active enzymes*) anhand ihrer Struktur und Sequenz in Glycosidhydrolase-Familien (GH-Familien) eingeteilt (Lombard et al., 2014). Das Genom von *H. thermocellum* beinhaltet Gene für mehr als 70 cellulosomale Enzyme, darunter 24 Cellulasen (Leis et al., 2017; Zverlov et al., 2005a). Bei diesen Cellulasen kommen Module der Familien GH5, GH8, GH9, GH44, GH48 und GH124 vor (Leis et al., 2017), was darauf hindeutet, dass die einzelnen Enzyme unterschiedliche Aktivitäten und Reaktionsmechanismen aufweisen. So werden die Cellulasen von *H. thermocellum* in vier Gruppen mit unterschiedlichen Hydrolyse-Mechanismen eingeteilt: Exo-Modus Cellobiohydrolasen (CBH), unspezifische Endoglucanasen (EG), prozessive Endoglucanasen mit Cellobiose als Hauptprodukt (pEG2) und prozessive Endoglucanasen mit Cellotetraose als Zwischenprodukt. Leis et al. (2017) konnten zeigen, dass künstliche Mini-Cellulosomen am aktivsten waren, wenn alle vier Hydrolyse-Modi im Komplex vertreten waren.

Obwohl *H. thermocellum* auf Cellulose und Cellodextrine als Kohlenstoff- und Energiequelle spezialisiert ist (Schwarz, 2001), sind die Mehrheit der cellulosomalen Enzyme keine Cellulasen. Stattdessen dienen diese Enzyme dem Abbau anderer pflanzlicher Polysaccharide wie Hemicellulose und Pektin (Blumer-Schuetz et al., 2014),

welche in der pflanzlichen Zellwand die Cellulosefasern umgeben. Somit ist die Aktivität von Hemicellulasen und Pektinasen für *H. thermocellum* von großer Bedeutung, da sie die Cellulosefasern freilegen und so für die Cellulasen zugänglich machen (Zverlov et al., 2005a).

In dieser Arbeit wurden Cel8A als Vertreter der EG, Cel9D (pEG2) und Cel9R (pEG4) als Beispielenzyme ausgewählt, um möglichst viele Cellulase-Modi abzudecken. Hinzu kam die Xyloglucanase Xgh74A als Beispiel für eine Hemicellulase. Die Größe und die Module dieser vier Enzyme sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Größe und Modulstruktur der vier Enzyme Cel8A, Cel9D, Cel9R und Xgh74A aus *H. thermocellum*. Länge und Molekulargewicht (MW) entsprechend der UniProt-Datenbank (<https://www.uniprot.org/>, The UniProt Consortium, 2019). Modulstruktur (von N- zu C-Terminus) nach (Blumer-Schuetz et al., 2014).

	UNIPROT ID	LÄNGE [AS]	MW [KDA]	MODULSTRUKTUR
Cel8A	A3DC29	477	52,6	GH8-DocI
Cel9D	A3DDN1	649	72,4	GH9-DocI
Cel9R	Q70DK3	736	82,1	GH9-CBM3c-DocI
Xgh74A	Q70DK5	842	92,4	GH74-DocI

Cel8A und Cel9D gehören zu den ersten charakterisierten *H. thermocellum*-Enzymen (Béguin et al., 1988; Joliff et al., 1986; Schwarz et al., 1986). Beide Enzyme hydrolysieren Gersten- β -1,3/1,4-Glucan (Barley β -Glucan, BBG), Carboxymethylcellulose (CMC), PASC (*phosphoric acid swollen cellulose*) und kristalline Cellulose (Avicel) und entfalten ihre höchste Aktivität um pH 6 (Béguin et al., 1988; Leis et al., 2017; Schwarz et al., 1986). Das Temperaturoptimum von Cel8A ist mit 75 °C höher als das von Cel9D mit 60 °C (Béguin et al., 1988; Peng et al., 2011; Schwarz et al., 1986).

Im Gegensatz zu Cel8A und Cel9D wurden Xgh74A und Cel9R erst 2005 entdeckt, nachdem die Genomsequenz von *H. thermocellum* verfügbar war. Cel9R hydrolysiert PASC, CMC und BBG und zeigt seine höchste Aktivität bei 78,5 °C und pH 6,0. Zudem weist es eine Nebenaktivität gegen Xyloglucan (XG) auf (Zverlov et al., 2005c). XG ist eine Hemicellulose, die z.B. in primären Zellwänden der Dicotyledonen in großer Menge vorkommt und deren Rückgrat aus β -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten eine Vielzahl an

kurzen, Xylose-reichen Seitenketten trägt. Diese Seitenketten spielen für die Substraterkennung durch Xgh74A eine entscheidende Rolle: Während Xgh74A CMC oder PASC kaum oder überhaupt nicht hydrolysieren kann, baut es XG sehr effizient ab. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind dabei pH 6,4 und 75 °C (Zverlov et al., 2005b).

Während *H. thermocellum* auf den Abbau pflanzlicher Biomasse spezialisiert ist, eignet sich dieses Bakterium nicht für die Enzymproduktion. So stellten schon Béguin et al. (1988) fest, dass die Produktion von *H. thermocellum*-Cellulasen in rekombinanten *E. coli* Stämmen einfacher war als die Anreicherung der Cellulasen aus dem Überstand von *H. thermocellum*. Der Hauptgrund, warum eine effiziente Enzymproduktion anderer Stämme bedarf, ist die Tatsache, dass das anaerobe Wachstum von *H. thermocellum* vergleichsweise langsam stattfindet. Die kürzesten Generationszeiten liegen bei ca. 6–7 h, wohingegen etablierte Produktionsstämme wie *E. coli* oder *B. subtilis* Verdopplungszeiten von unter 30 min aufweisen (Lynd et al., 2002, 1989; Sonnleitner & Chmiel, 2011). Desweiteren kann *H. thermocellum* Substrate wie Glucose oder Glycerin nicht verwerten, sondern ist auf Cellodextrine als C-Quelle angewiesen (Schwarz, 2001). Somit erreicht *H. thermocellum* deutlich niedrigere Zelldichten und niedrigere Ausbeuten, weshalb heterologe, sekretorische Produktionsansätze für wirtschaftliche Ausbeuten erforderlich sind. Dies ist jedoch mit besonderen Herausforderungen verbunden. Gerade der modulare Aufbau, dem die cellulosomal Enzyme ihre besonderen Eigenschaften verdanken, erschwert die heterologe Produktion. Ein Grund hierfür ist z.B. die *linker*-Region zwischen den einzelnen Modulen, welche anfällig für proteolytischen Abbau ist (Gustavsson et al., 2001; Linder & Teeri, 1997).

1.2.2 Probleme bei der sekretorischen Produktion heterologer Enzyme

Die sekretorische Proteinproduktion ist im Vergleich zur intrazellulären Expression ein deutlich komplexerer Vorgang. Der Grund hierfür ist, dass nicht nur die Proteinbiosynthese und die Faltung effizient ablaufen müssen, sondern zusätzlich die Sekretion mit allen dazugehörigen Prozessschritten korrekt durchlaufen werden muss.

Entsprechend ergibt sich eine Vielzahl von Nadelöhren, die sich potenziell negativ auf die Produktionsleistung eines sekretorischen Proteinproduktionssystems auswirken und die bei der Etablierung eines neuen Produktionswirts von Belang sein können:

i. Transkription & Translation

Unabhängig von der Art des Produktionssystems – sekretorisch oder intrazellulär – ist die Regulation der Genexpression der erste entscheidende Schritt. Die Wahl eines geeigneten Promotors ist somit von großer Bedeutung, um ein heterologes Gen erfolgreich zu exprimieren. Die Fachliteratur konzentriert sich dabei meist auf die Identifizierung und Anwendung möglichst starker Promotoren, um hohe Ausbeuten zu erzielen (Li et al., 2004). Hinzu kommt die Steigerung der Translationseffizienz, beispielsweise durch Codon-Optimierung des Zielgens oder Co-Expression seltener tRNAs. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei der sekretorischen Proteinproduktion der stärkste Promotor nicht zwangsläufig die besten Ergebnisse liefern muss, da zu hohe Transkriptions- und Translationsraten unter Umständen zu einer Überlastung der Sekretionsmaschinerie führen könnten.

ii. Proteinfaltung

Die Proteinsekretion mittels des Sec-Mechanismus stellt besondere Anforderungen an die Faltung des Zielproteins dar. Solange das Zielprotein intrazellulär lokalisiert ist, muss der sekretionskompetente, ungefaltete Zustand aufrechterhalten werden. Sobald es den extrazellulären Raum erreicht hat, muss es jedoch rasch und korrekt falten, um Proteolyse zu vermeiden und seine aktive Konformation einzunehmen. Es wurde vielfach gezeigt, dass hierbei intra- und extrazelluläre Chaperone von großer Bedeutung sind (Chen et al., 2015; Li et al., 2004; Westers et al., 2004).

iii. Wahl eines geeigneten Signalpeptids

Die Sequenz des SP ist ein wichtiger limitierender Faktor bei der Sekretion, damit das Zielprotein effizient zur Translocase transportiert werden kann (Li et al., 2004; Westers et al., 2004). Da die theoretische Vorhersage eines idealen SP für ein gegebenes

Zielprotein bisher nicht möglich ist, müssen geeignete SP für jedes Zielprotein individuell und experimentell ermittelt werden (Bien et al., 2014; Brockmeier et al., 2006; Degering et al., 2010; Song et al., 2015).

iv. Abspaltung des SP

Nach der erfolgreichen Translokation des Prä-Proteins durch die Cytoplasmamembran muss das SP abgespalten werden und das Zielprotein korrekt zu seiner nativen Konformation falten. Die Abspaltung der SP erfolgt durch die Aktivität von SPasen, beispielsweise SipS und SipT in *B. subtilis*. Falls die Prozessierung des SP durch die vorhandenen SPasen limitiert ist, sodass das SP nicht schnell genug abgespalten wird, kann das Protein nicht vollständig freigesetzt werden, was die Kapazität der Translocase verringert (Li et al., 2004); die Translocase wird also durch das noch unvollständig prozessierte Protein blockiert.

v. Proteolyse

Proteolytischer Abbau des heterologen Zielproteins nach der Sekretion ist der Hauptgrund für niedrige Ausbeuten bei der sekretorischen Proteinproduktion (Westers et al., 2004). Bazillen verfügen über zwei Arten von extrazellulären Proteasen: *feeding* Proteasen dienen zum (unspezifischen) Abbau von Proteinen, um die freigesetzten Aminosäuren als Nahrungsquelle nutzen zu können, während *quality control* Proteasen sekretierte Proteine an der Membran bzw. im Bereich der Zellwand „scannen“, um falsch gefaltete Proteine zu erkennen und abzubauen (Pohl et al., 2013). Während die wirtseigenen extrazellulären Proteine gegenüber beiden Proteasearten meist resistent sind, werden heterologe Proteine oft sehr schnell abgebaut (Li et al., 2004). Eine effektive Lösung des Problems ist die Deletion von Proteasegenen aus dem Genom des Produktionswirts. Beim bestens erforschten und intensiv angewendeten *B. subtilis* existieren diverse Protease *knock-out* Mutanten, wie beispielsweise *B. subtilis* WB800, bei dem alle sieben *feeding* Proteasen und die *quality control* Protease WprA ausgeschaltet wurden (Wu et al., 2002). Bei neu entwickelten Produktionsstämmen sind jedoch oft keine *knock-out* Stämme verfügbar, sodass die Proteasegene erst deletiert

werden müssen oder die Proteaseproduktion durch andere Verfahren, beispielsweise die Medienzusammensetzung, verringert werden muss.

Hinzu kommen zwei weitere Punkte, die großen Einfluss auf die Proteinproduktion haben können. Der Energiehaushalt eines Produktionsorganismus ist ein allgemeiner Einflussfaktor bei der Ausbeute biotechnologischer Produkte (Westers et al., 2004). Entsprechend kann durch die Medienzusammensetzung die Ausbeute verbessert werden, beispielsweise durch die Wahl der C-Quelle oder das gezielte Zufüttern von limitierenden Substanzen wie Produktvorstufen oder Aminosäuren für die Proteinbiosynthese (Korneli et al., 2012; Westers et al., 2004). Schließlich ist auch der Produktionswirt selbst entscheidend. Während etablierte Stämme wie *B. subtilis* und *B. licheniformis* (wirtseigene) Zielenzyme in Konzentrationsbereichen von 20 g/l sekretieren können (Schallmey et al., 2004), werden alternative Stämme benötigt, um auch heterologe Enzyme in wirtschaftlich relevanten Konzentrationen sekretorisch produzieren zu können (Freudl, 2018; Küppers et al., 2014).

1.3 Genübertragung in Bakterien

Um neue Proteinproduktionsstämme etablieren zu können, bedarf es effizienter, genetischer Werkzeuge, die für einen ausgewählten Stamm entwickelt oder angepasst werden müssen (Küppers et al., 2014). Die Genübertragung ist somit der Dreh- und Angelpunkt für die heterologe Proteinproduktion.

Während für *B. subtilis* effiziente Transformationsprotokolle für die Übertragung rekombinanter DNA existieren, ist es deutlich herausfordernder, derartige Versuche in anderen Bazillen erfolgreich durchzuführen (Heinze et al., 2018a). Dies trifft insbesondere für Wildtypstämme zu, da diese schwer gentechnisch zu modifizieren sind (Hertel et al., 2015; Schallmey et al., 2004).

Dies liegt unter anderem daran, dass die Protokolle für die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA in der Regel auf jede einzelne Art speziell zugeschnitten werden müssen. Übliche Methoden, um rekombinante DNA in Bakterien einzubringen, sind beispielsweise die Ausnützung natürlicher Kompetenz (bei *B. subtilis*),

Protoplastentransformation (verbreitet für *B. megaterium* eingesetzt), Elektroporation und der konjugative Plasmidtransfer (Mobilisierung) von *E. coli* zu Gram-positiven Empfängerstämmen. In den meisten Fällen müssen hierfür kompetente Zellen mit aufwändigen Verfahren hergestellt werden, wobei normalerweise individuelle Methoden für unterschiedliche Spezies benötigt werden. Zudem existieren bei diesen artspezifischen Verfahren oft weitere Nachteile: Protoplasten sind sehr empfindlich in der Handhabung und können nicht eingefroren werden, um sie zu lagern. Natürliche Kompetenz ist ein seltenes Phänomen, das zwar natürlicherweise in *B. subtilis* vorkommt, aber nicht auch in allen anderen *Bacillus*-Arten. Zudem kann die Transformationseffizienz bei der natürlichen Kompetenz niedrig sein. Die Elektroporation ist zwar effizient und vielseitig einsetzbar, aber auch hier müssen die idealen Parameter wie Medienzusammensetzung und elektrische Feldstärke individuell angepasst werden (Schumann, 2007; Trieu-Cuot et al., 1987; Xue et al., 1999).

Im Vergleich mit den anderen genannten DNA-Übertragungsmethoden nimmt die Konjugation eine besondere Stellung ein, da bei dieser Methode keine gereinigte, isolierte DNA eingesetzt wird, sondern das Zielplasmid direkt von der Donor- auf die Akzeptorzelle übertragen wird. Die Konjugation wurde bei *E. coli* schon 1946 beobachtet (Lederberg & Tatum, 1946). Seit den 1970er Jahren wurden konjugative Plasmide intensiv erforscht und später für den gezielten Gentransfer, auch zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Spezies, eingesetzt (Figurski & Helinski, 1979; Ingram et al., 1973; Pansegrau et al., 1990; Rachinger et al., 2013; Schäfer et al., 1990; Soutschek-Bauer & Staudenbauer, 1987; Trieu-Cuot et al., 1987).

Selbst etablierte Gentransfermethoden (z.B. Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen, Protoplastentransformation oder auch Elektroporation) lassen sich oft nur aufwendig auf einen anderen Stamm derselben Art zu übertragen. Dies kann z.B. an unterschiedlichen Medienanforderungen (z.B. Zusammensetzung des Regenerationsmediums nach der Protoplastentransformation) oder anderen Restriktionssystemen liegen. Entsprechend wäre eine Gentransfermethode, die sich ohne Protokollanpassungen für verschiedene Bazillen eignet, sehr nützlich, beispielsweise um

herauszufinden, welcher Stamm oder welche Art sich am besten für die Expression eines Zielgens eignet.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Um die sekretorische Produktion heterologer Enzyme effizienter zu gestalten, werden neue Produktionsstämme benötigt. Dazu sollten in der vorliegenden Arbeit zuerst ein universell einsetzbares Expressionsplasmid und eine passende Genübertragungsmethode entwickelt werden. Dieses System sollte dann im zweiten Teil der Arbeit die Grundlage liefern, um ein ausgewähltes Bakterium auf seine Eignung als effizienten Wirt für die sekretorische Produktion heterologer Glycosidhydrolasen zu untersuchen und die Produktionsleistung zu optimieren.

Die Wahl eines Wirtsorganismus für die Produktion eines heterologen Proteins hängt stark von dem Zielprotein selbst ab. Um zukünftig verschiedene Kandidatenstämme schnell und einfach auf ihre Eignung für die Produktion eines gegebenen Zielproteins testen zu können, sollte im ersten Teil dieser Arbeit ein Expressionsplasmid mit breitem Wirtsspektrum entwickelt werden. Dieses Expressionsplasmid sollte mit einer einzigen Methode, möglichst ohne spezielle Gattungs-, Art- oder Stamm-spezifische Protokollanpassungen, in verschiedenste Bazillen übertragbar sein. Um das breite Wirtsspektrum des neu entwickelten *Shuttle*-Plasmids und der Transfermethode zu demonstrieren, sollte die Übertragbarkeit dieses Plasmids auf verschiedene Arten unterschiedlicher Bazillen-Gattungen untersucht werden. Die Funktionalität der Expressionskassette in so erzeugten, Plasmid-tragenden Kolonien wurde anhand des fluoreszierenden Reporterproteins sfGFP gezeigt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte das neu entwickelte Plasmidsystem verwendet werden, um einen ausgewählten neuen, Gram-positiven Bakterienstamm für die sekretorische Produktion heterologer Glycosidhydrolasen zu etablieren. Als heterologe Zielgene wurden *cel8A*, *cel9D*, *cel9R* und *xgh74A* aus dem thermophilen, anaeroben und cellulolytischen Bakterium *H. thermocellum* ausgewählt. Nach der Auswahl eines geeigneten Kandidatenstammes sollte zunächst der Machbarkeitsnachweis der sekretorischen Produktion der Zielenzyme erbracht werden. Anschließend sollte die

Produktionsleistung optimiert werden, indem der Einfluss verschiedener Stellschrauben wie beispielsweise Promotoren, SP, Koexpression von Chaperonen oder die Medienzusammensetzung analysiert wurde. Zudem sollte, mit Hinblick auf potenzielle technische Anwendungen, das Verhalten des neuen Produktionsstammes im Bioreaktor untersucht werden.

Zusammenfassend sollte in dieser Arbeit durch ein neues Genübertragungssystem einerseits ein allgemeiner Beitrag zur Verfügbarkeit neuer bakterieller Wirte für die sekretorische Produktion heterologer Proteine geliefert werden, und andererseits anhand eines konkreten Fallbeispiels ein neuer Stamm für die Produktion der thermophilen Glycosidhydrolasen Cel8A, Cel9D, Cel9R und Xgh74A aus *H. thermocellum* etabliert werden.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Kits und Geräte

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Kits für molekularbiologische Zwecke

NAME	HERSTELLER	VERWENDUNGSZWECK
<i>B. subtilis</i> Secretory Protein Expression System	TaKaRa-Bio Inc., Kusatsu, Japan	Erstellung von SP-Bibliotheken
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech Laboratories, Inc., Mountainview, USA	Einfügen der SP-Mischung in linearisierte Vektoren (Erstellung von SP-Bibliotheken)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)	Isolierung von DNA-Fragmenten bis 4 kb aus Agarosegelen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen	Reinigung von PCR-Produkten bis 4 kb
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen sowie Reinigung von PCR-Produkten. Für Fragmente > 4 kb
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel	Isolierung von Plasmid-DNA aus Gram-positiven Bakterien
innuPREP Bacteria DNA Kit	Analytik Jena AG (Jena)	Isolierung von gDNA.

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Geräte

ANWENDUNG	GERÄT	HERSTELLER
ALLGEMEINE LABORAUSSTATTUNG		
Reinstwasseranlage	MicroPure	TKA Wasseraufbereitungssysteme (Niederelbert)
Thermomixer	ThermoMixer C	Eppendorf AG (Hamburg)
	Thermomixer 5426	Eppendorf AG
Wasserbäder	2219 Multitemp II Thermostatic Circulator	LKB (Bromma, Schweden)
	Haake DC 10	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
pH-Meter	inoLab pH 7110	WTW - a xylam brand (Weilheim)
Kühl-Gefrierkombination (4 °C, -20 °C)	AEG Santo S73402CNW2	Electrolux Hausgeräte GmbH (Nürnberg)
	-80 °C Tiefkühlschrank	Ultra Low Temperature Freezer VIP™ Series
AGAROSEGELELEKTROPHORESE		

Elektrophoresekammer	Horizontal Gel Electrophoresis System No. 1085, Modell H3	Bethesda Research Laboratories, Inc. (Rockville, USA)
Dokumentation von Agarosegelen	Alpha Imager Mini	ProteinSimple (Santa Clara, USA)
Netzteil	EPS 600 Electrophoresis Power Supply	Pharmacia LKB
FERMENTATION		
Steuereinheit inkl. Sonden für Temperatur, OD (nur im 10 l- Maßstab) und Antischaum, sowie Steuerungssoftware Multi Fermentor Control System / Data Acquisition	BIOSTAT B-MO Twin	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Rührkessel	Univessel, 2 l und 10 l	Sartorius Stedim Biotech
pH-Elektrode	Easyferm Plus VP 225/325	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
pO ₂ -Sensor	Oxyferm FDA VP 225/325	Hamilton Bonaduz AG
INKUBATION VON MIKROORGANISMEN		
Inkubationsschüttler (Brutraum)	Orbitron	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Programmierbarer Brutschrank, inkl. Kühlfunktion und Schüttler	Innova 42R	New Brunswick (Edison, USA)
MASSENSPEKTROMETRIE (LC-MS/MS)		
HPLC-System	nanoLC-Ultra 1D+	Eksigent (Dublin, USA)
Vorsäule	ReproSil-Pur 120 ODS-3 5 µm, Innendurchmesser 75 µm, Länge 2 cm	Dr. Maisch GmbH (Ammerbuch-Entringen)
Analytische Säule	ReproSil-Gold 120 C18 3 µm, Innendurchmesser 75 µm, Länge 40 cm	Dr. Maisch GmbH
Massenspektrometer	Q-Exacte HF	Thermo Fisher Scientific
MEHRKANALPIPETTEN		
Elektronische 8-Kanal-Pipetten	Voyager II, 10-300 µl Voyager II, 5-125 µl	Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Elektronische 96-Kanal-Pipette	Viaflo 96, 10-300 µl	Integra Biosciences AG
MIKROSKOPIE		
Phasenkontrastmikroskop	Axio Skope.A1	Carl Zeiss GmbH (Jena)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.M1	Carl Zeiss GmbH
PCR UND DNSA-ASSAY		
Thermocycler	Biometra TAdvanced	Analytik Jena
Hitzeversiegler für Mikrotiterplatten	4S3 Semi-Automated Heat Sealer	4titude (Berlin)
PROTEINREINIGUNG		
FPLC-System	ÄktaPurifier	GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, England)
FPLC-System	Pharmacia FPLC System, bestehend aus papierbasiertem Rekorder (Rec102), 210 nm UV Spektrometer (Unico),	Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden)

Säulchen für die Proteinreinigung mittels IMAC	Gradientenmischer (GP-250) und Pumpensystem (P-500) HisTrap FF Crude (5 ml oder 1 ml)	GE Healthcare Life Sciences
SDS-PAGE UND WESTERNBLOT		
SDS-Elektrophoresekammern	Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Halbtrockener Blotting-Apparat Netzteil	Mini-Protean Tetra Cell 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit 2297 Macrodrive 5 Constant Power Supply	Bio-Rad Laboratories Pharmacia LKB
Hybridisierofen	Hybridiser HB-1	Techne (Jahnsdorf/Erzgebirge)
Wippschüttler (Färben/Entfärben von SDS-PA-Gelen)	Polymax 2040	Heidolph Instruments Labortechnik (Schwabach)
STERILISIEREN VON MATERIALIEN UND BIOLOGISCHEN ABFÄLLEN		
Autoklav	Varioklav	HP-Medizintechnik GmbH (Oberschleißheim)
Heizschrank	Function Line	Heraeus (Hanau)
UV/VIS SPEKTROSKOPIE		
Spektral-Fluoreszenz-Photometer	BioSpectrometer Fluorescence	Eppendorf AG (Hamburg)
Mikrovolumen-Messzelle zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen im BioSpectrometer Fluorescence	µCuvette G1.0	Eppendorf AG
Photometer für Mikrotiterplatten	Sunrise Absorbance Microplate Reader	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
WIEGEN UND AUSTARRIEREN		
Waagen	1204 MP Entris 2201-1S 125A SCS	Satorius AG (Göttingen) Satorius AG Precisa Gravimetrics AG (Dietikon, Schweiz)
ZENTRIFUGIEREN		
Zentrifuge für Mikrotiterplatten, Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml) und Deep-Well-Blöcke, kühlbar	Rotina 420R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Tischzentrifuge für 1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße, kühlbar	Heraeus Fresco 21	Thermo Fischer Scientific
Tischzentrifuge zum Anzentrifugieren von PCR-Reaktionsgefäßen und Reaktionsgefäßen bis 2 ml	Mini-Centrifuge SU1550	Sunlab Instruments (Mannheim)
Ultrazentrifuge für 50 ml-, 250 ml- und 500 ml-Gefäße	Sorvall Lynx 6000, Rotoren: A27-8x50, F14-6x250y, F12S-6x500Lex	Thermo Fischer Scientific

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Software

PROGRAMM	QUELLE/HERAUSGEBER
BioMath Calculator	Promega (Fitchburg, USA)
Blast-Suite	Altschul et al., 1997, NCBI (Bethesda, USA)
BPROM	Solovyev & Salamov, 2011
Clone Manager Professional 9	Scientific & Educational Software (Denver, USA)
Clustal Omega	Sievers et al., 2011
ExpASy	Gasteiger et al., 2005, Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, Schweiz)
GCUA	Fuhrmann et al., 2004
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Illustrator CS2	Adobe (San José, USA)
Magellan	Tecan Group
RBS Calculator v2.0	Salis Lab, Pennsylvania State University (University Park, USA)
SigmaPlot, V. 11	SYSTAT Software GmbH (Erkrath)
SignalP 4.1	Center for Biological Sequence Analysis Technische Universität Dänemark (Kongens Lyngby, Dänemark)
UNICORN, V. 5.31	GE Healthcare Life Sciences

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Chemikalien

SUBSTANZ	HERSTELLER
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	AppliChem GmbH, Gatersleben
3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Aceton (für die Molekularbiologie)	AppliChem
Acrylamid 4K-Lösung (30 %)	AppliChem
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem
Ammoniumsulfat (> 99 %)	Appllichem
Antischaummittel Antifoam 204	Sigma Aldrich
Azo-Carboxymethyl-Cellulose (Azo-CMC)	Megazyme, Bray, Irland
Barley- β -Glucan (BBG, aus Gerste)	Megazyme, Bray, Irland
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	GERBU Biotechnologie GmbH, Geiberg
Calciumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt
Carbenicillin (Dinatrium-Salz)	Carl Roth
Carboxymethylcellulose, Natriumsalz, niedrige Viskosität	Sigma Aldrich
Coomassie Brillant Blau G-250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
D-(-)-Sorbitol (> 99 %)	AppliChem
D-(+)-Glucose-Monohydrat (≥ 99 %)	AppliChem
D-(+)-Xylose (99 %)	Sigma Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck Millipore
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck Millipore
Ethanol (99,8 %, für die Molekularbiologie)	AppliChem
Ethidiumbromid, 1 %-ige Lösung	AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Biofroxx GmbH, Einhausen
Essigsäure (100 %, für die Molekularbiologie)	AppliChem
Glycerin (> 99 %)	Alfa Aesar, Haverhill, USA
Glycin	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
Imidazol	BioFroxx
Isopropanol (> 99,8 %, für die Molekularbiologie)	AppliChem
Kaliumchlorid	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore
Kalium-Natrium-Tartrat	AppliChem
Kanamycinsulfat	AppliChem
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck Millipore
Methanol (99,5 %, zur Synthese)	AppliChem
Natriumacetat Trihydrat	VWR International

Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat	Merck Millipore
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
Natriumsulfat	Thermo Fisher Scientific
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	AppliChem
Nickel(II)-sulfat Hexahydrat	Sigma Aldrich
Phenol	Sigma Aldrich
Polymyxin B-Sulfat (≥ 80 %)	Carl Roth
Salzsäure, 37 %	AppliChem
Sojapepton	Life Technologies
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	AppliChem
Trypton	Carl Roth
Tween-20	Promega
Zinkacetat	Sigma Aldrich

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die lyophilisierten Produkte wurden mit MilliQ-Wasser mit einer Zielkonzentration von 100 pmol/μl gelöst und bei -20 °C gelagert. Bei Primern für das Gibson-Assembly wurden die Überhänge bei der Berechnung der Schmelztemperaturen nicht berücksichtigt.

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Oligonucleotide. fw: *forward primer*, rv: *reverse primer*

NAME	SEQUENZ (5' - 3')	LÄNGE [NT]	BESCHREIBUNG / ZWECK
IDENTIFIZIERUNG VON BAKTERIENARTEN			
616V	AGAGTTTGATYMTGGCTC	18	Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens, Y = C oder T, M = A oder C,
630R	CAKAAAGGAGGTGATCC	17	K = G oder T (Loy et al., 2005)
KLONIERUNG UND ÜBERPRÜFUNG VON PBACOV			
OriT_traJ_fw	TCCCCGAAAAGTGCCACCTGAC TTAGTGCTTTACGGCACCTCG	43	PCR Primerpaar für die Amplifizierung von oriT/traJ aus pKVM4 (Kostner et al., 2017) zur Erstellung von pBACOV mittels Gibson Assembly
OriT_traJ_rv	CATGATAATAATGGTTTCTTAGA CGCTTCGGGGTCATTATAGCG	44	
Fw_pUC_for_Gibson	CAAACCTGCATAACTATTATGTAC GAGCAAAAGGCCAGC	38	PCR Primerpaar für die Amplifizierung des pUC-Anteils von pBE-S zur Erstellung von pBACOV mittels Gibson Assembly
Rv_pUC_from_pBE-S	GTCAGGTGGCACTTTTCG	18	
pUB110_backbone_fw	GTCTAAGAAACCATTATTATCAT	26	PCR Primerpaar für die Amplifizierung

pUB110_backbone_rv	GAC CATAATAGTTATGCAGTTTGTAG 28 AATGC	des pUB110-Anteils und der Expressionskassette inkl. des hypothetischen Transkriptionsterminators aus pBE-S zur Erstellung von pBACOV mittels Gibson Assembly
QC_g2015t_1	GCGGCGGCGGCAGGCATGAGCC 24 TG	Primerpaar für die QuikChange-Mutagenese (g2015t) zur Entfernung der EagI-Restriktionsschnittstelle im traJ-Gen von pBACOV
QC_g2015t_2	CAGGCTCATGCCTGCCGCCGCC 24 GC	
pBE-S_Seq_rv	CGATGAGCGCATTGTTAG 18	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
pBE-SCi_Seq0276fw	GCTCACGCTGTAGGTATC 18	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
pBE-SCi_Seq0993fw	CGGCTCCAGATTTATCAG 18	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
pBE-SCi_Seq1795fw	GTTCCGCGCACATTTCC 17	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
pBE-SCi_Seq2552fw	CCGTGTCGTTCTGTCCACTC 20	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
pBE-SCi_Seq2559fw	GTTCTGTCCACTCCTGAATC 20	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
pBE-SCi_Seq3333fw	GGAGAGCACCGTTCTTATTC 20	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
pBE-SCi_Seq4141fw	GCCATGTTTTATTGCTCTC 19	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
pBE-SCi_Seq4894fw	CGAGTCTCTACGGAAATAGC 20	Plasmidspezifischer Sequenzierprimer (pBACOV)
sfGFP_fw	TAAGCAAAGGAGAGGGACGC 44 GTATGAGCAAAGTGAAGAACT G	PCR Primerpaar für die Amplifizierung von <i>sfGFP</i> aus pET28A- <i>sfGFP</i> und Insertion in pBACOV zur Erzeugung von pBACOV- <i>sfGFP</i>
sfGFP_rv	CATTAGTGGTGATGATGGTGAT 53 GTCTAGATTTATACAGTTCATCC ATACCATG	
KLONIERUNG ALTERNATIVER PROMOTOREN		
Pxyl_original_Gibson_fw	GCCGTCTGTACGTTCCCTAAACTA 48 GTAACATATAAACAGCCAGTTG CCG	PCR Primerpaar für die Amplifizierung von P_{xylA} aus pHIS1525 und Insertion in pBACOV, um P_{aprE} zu ersetzen
Pxyl_original_Gibson_rv	GCCATAAGTACTTTTTTCATACG 53 CGTTGTACATTTCCCCCTTTGAT TTAAGTG	
Pxyl-RBS+Gibson_rv	GCCATAAGTACTTTTTTCATACG 56 CGTTGTACATTCACCTCCTTGAT TTAAGTGAAC	PCR Primer (reverse) für die Amplifizierung von P_{xylA+} aus pHIS1525. Durch einzelne mismatches wird die verbesserte rbs^+ (Malten et al., 2005) erzeugt. Insertion in pBACOV mittels Gibson Assembly.

ERZEUGUNG VON pCasPP-PLASMIDEN UND GENOMSPEZIFISCHE PRIMER ZUR ÜBERPRÜFUNG VON <i>P. POLYMYXA</i> AUF GENDELETIONEN		
Gibson_ObereFlanke_fw	GACAGATCTATCGATGCATGCC 46 ATGGCGCATTGCTTCAATCAG AC	PCR Primerpaar zur Klonierung der oberen Flanke des <i>spoIV</i> -Gens aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292
Gibson_Obere-Flanke_rv	GATTTTCGCCGTGGCTATTTGGCA 35 GAACAACAACGC	
Gibson_Untere-Flanke_fw	GCCAAATAGCCACGGCGAAATC 30 TCCTTTCC	PCR Primerpaar zur Klonierung der unteren Flanke des <i>spoIV</i> -Gens aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292
Gibson_untere-Flanke_rv	CTCGCGTCGGGCGATATCGGAT 43 CCGAGCCATCTTAGGGATGAC	
Gibson-OF-Spo0A-fw	GATCTATCGATGCATGCCATGG 39 CTCGGCTGCAGGTGTAG	PCR Primerpaar zur Klonierung der oberen Flanke des <i>spo0A</i> -Gens aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292
Gibson-OF-Spo0A-rv	CTTCATCAATCATTCTGACTCTT 45 TGACTTCCTCCTCATTGAGTG	
Gibson-UF-Spo0A-fw	CACTCAATGAGGAGGAAGTACA 46 AAGAGTCAGAATGATTGATGAA GC	PCR Primerpaar zur Klonierung der unteren Flanke des <i>spo0A</i> -Gens aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292
Gibson-UF-Spo0A-rv	CCGTCTGTACGTTCTAAACTAG 42 TCCGGTGGAATGGTCAATC	
Gibson-OF-sigF2-fw	GATCTATCGATGCATGCCATGG 41 CAAGACCGGGAGGAGAGTG	PCR Primerpaar zur Klonierung der oberen Flanke des <i>sigF2</i> -Gens aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292
Gibson-OF-sigF2-rv	GATTTCACTAAGATCCTGACTGT 55 AAAGGATCAACTCCTAATTATA TAAAGCTTTC	
Gibson-UF-sigF2-fw	CTTTATATAATTAGGAGTTGATC 50 CTTTACAGTCAGGATCTTAGTGA AATC	PCR Primerpaar zur Klonierung der unteren Flanke des <i>sigF2</i> -Gens aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292
Gibson-UF-sigF2-rv	GTCTGTACGTTCTAAACTAGTC 41 CTCTGCCACAACATACTG	
Gibson-OF-npr2-fw	GATCTATCGATGCATGCCATGG 39 CAGGATCTGTCCGGATG	PCR Primerpaar zur Klonierung der oberen Flanke des <i>npr2</i> -Gens aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292
Gibson-OF-npr2-rv	GATATGAGGATTATAGCGTATA 48 TGATCACTCTCCTCGATTAATGT CAG	
Gibson-UF-npr2-fw	CTGACATTAATCGAGGAGAGTG 50 ATCATATACGCTATAATCCTCAT ATCCC	PCR Primerpaar zur Klonierung der unteren Flanke des <i>npr2</i> -Gens aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292
Gibson-UF-npr2-rv	GTCTGTACGTTCTAAACTAGTC 43 ATCGGCTTGTGATCTTCTG	
Gibson-OF-npr1-rv	CGGGGAAGTTTGTATTTATTACC 44 ACTCTCCTCGATTAATGTCAG	PCR Primer zur Klonierung der oberen Flanke des contigs <i>npr1+2</i> aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292. Zusammen mit Gibson_OF_npr2_fw verwendet

Gibson-UF-npr1-fw	CTGACATTAATCGAGGAGAGTG 51 GTAATAAATACAAACTTCCCCG ATATTAC	PCR Primerpaar zur Klonierung der unteren Flanke des contigs <i>npr1+2</i> aus dem Genom von <i>P. polymyxa</i> DSM 292.
Gibson-UF-npr1-rv	GTCTGTACGTTCCCTAAACTAGTG 42 TACGAACCATAGCCCTAAG	
SpeI_spoIV-flank_rv	AAAAAACTAGTGTCGCCGTCA 32 TCGTTATGAG	PCR Primerpaar für die Umklonierung der homologen Flanken von <i>spoIV</i> aus pDel2 zur Erzeugung von pCasPP-sg1- <i>spoIV</i> und pCasPP-sg2- <i>spoIV</i>
SpeI_spoIV-flanks_fw	AAAAAACTAGTCGCATTCGCT 32 TCAATCAGAC	
XbaI_spo0A-flank_fw	AAAAAATCTAGAGCTCGGCTGC 30 AGGTGTAG	PCR Primerpaar für die Umklonierung der homologen Flanken von <i>spo0A</i> aus pDel3 zur Erzeugung von pCasPP-sg1- <i>spo0A</i> und pCasPP-sg2- <i>spo0A</i>
XbaI_spo0A-flank_rv	AAAAAATCTAGACCGGTGGAAT 30 GGTCAATC	
XbaI_sigF2-flank_fw	AAAAAATCTAGACAAGACCGGG 31 AGGAGAGTG	PCR Primerpaar für die Umklonierung der homologen Flanken von <i>sigF2</i> aus pDel4 zur Erzeugung von pCasPP-sg1- <i>sigF2</i> und pCasPP-sg2- <i>sigF2</i>
XbaI_sigF2_flank_rv	AAAAAATCTAGACCTCTGCCAC 31 AACATACTG	
XbaI_npr2-flank_fw	AAAAAATCTAGAGCAGGATCTG 30 TCCGGATG	PCR Primerpaar für die Umklonierung der homologen Flanken von <i>npr2</i> aus pDel7 zur Erzeugung von pCasPP-sg1- <i>npr2</i> und pCasPP-sg2- <i>npr2</i>
XbaI_npr2-flank_rv	AAAAAATCTAGACATCGGCTTG 33 TTGATCTTCTG	
XbaI_npr1+2-flank_rv	AAAAAATCTAGAGTACGAACCA 32 TAGCCCTAAG	PCR Primerpaar für die Umklonierung der homologen Flanken von <i>npr1+2</i> aus pDel8 zur Erzeugung von pCasPP-sg1- <i>npr1+2</i> und pCasPP-sg2- <i>npr1+2</i>
XbaI_npr1+2-flank_fw	AAAAAATCTAGACAGGATCTGT 30 CCGGATGC	
Seq_flanks_fw	ACTTCACCTATCCTGCCC 18	Überprüfung der Insertion der homologen Flanken in pCasPP-Konstrukte (analytische PCR und Sequenzierung)
Seq_flanks_rv	ACAGGTATCCGGTAAGCG 18	Überprüfung der Insertion der homologen Flanken in pCasPP-Konstrukte (analytische PCR und Sequenzierung)
Seq_sg_fw	TGGCCGATGCTGGGAGAAG 19	Überprüfung der Insertion der sgRNA in pCasPP-Konstrukte (analytische PCR und Sequenzierung)
Seq_sg_rv	AGCCAACCAGGAAGGGCAG 19	Überprüfung der Insertion der sgRNA in pCasPP-Konstrukte (analytische PCR)
Check_Seq3_135772_fw	ACGGACAACATCCTCTTCTG 20	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>spoIV</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
Check_Seq3_139065_rv	CGGGCCAGAACTGGATTG 18	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>spoIV</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
Check_Seq4_244588fw	GACATCACGCTTTGTGCGAG 19	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>spo0A</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq4_271023_fw	GCCGGATGGTGAAATTG 18	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>sigF2</i> (analytische PCR /

CheckSeq8inv_214296fw	GTACGGGCGTACGATTCAC	19	Sequenzierung) Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>npr2</i> bzw. <i>npr1+2</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq4_273681rv	AATCGCGGCATGATATCCAG	20	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>sigF2</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq8inv_218188rv	GATTTGGACGGAGGAAGAG	19	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>npr2</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq8inv_220440rv	TTCCAGCCGGGTGAATG	18	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>npr1+2</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq4_247260rv	CATGAATGTCGAGAAGAGG	19	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 auf Deletion von <i>spo0A</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq5_278180fw	CTTGACAGCAGCAACTC	18	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 und DSM 36 ^T auf Deletion von <i>pepQ</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq5_280822rv	AGAACTCGGTCTGCCTAC	18	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292, DSM 36 ^T und DSM 365 auf Deletion von <i>pepQ</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq5_299405fw	TAGCCGCAATTCCTACAG	18	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292 und DSM 365 auf Deletion von <i>pepC</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
CheckSeq5_302177rv	CCAAACGGGAAGATCTAC	18	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 292, DSM 36 ^T auf Deletion von <i>pepC</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
DSM36_Seq16_273492rv	CTGACCACAGGTTGATAGG	19	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 36 ^T auf Deletion von <i>pepC</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
DSM365_PepC_17389fw	TGCAGGCTTGACAGATGG	18	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 365 auf Deletion von <i>pepC</i> (analytische PCR / Sequenzierung)
DSM365_PepQ_41406_rv	CCTTCGACAGCAGTAACTC	19	Überprüfung von <i>P. polymyxa</i> DSM 365 auf Deletion von <i>pepQ</i> (analytische PCR / Sequenzierung)

Oligonucleotide zur Klonierung von sgRNAs für CRISPR/Cas9-Plasmide sind in Tabelle 7 dargestellt. Je Zielgen wurden zwei unterschiedliche sgRNAs entwickelt. Das *Annealing* der Oligonucleotidpaare und die Insertion in das pCasPP-Plasmid sind in Kapitel 2.6.9 beschrieben.

Tabelle 7: Oligonucleotide zur Klonierung von sgRNAs für CRISPR/Cas9-Plasmide. Die ersten vier Nucleotide am 5' Ende (ACGC beim fw-Oligonucleotid bzw. AAAC beim rv-Oligonucleotid) dienen als Überhang für die Insertion in den linearisierten Vektor, die folgenden 20 Nucleotide ergeben die Sequenz des spezifitätliefernden Protospacers.

NAME	SEQUENZ (5' - 3')	ZIELGEN
spoIV_sg1_fw	ACGCCACTTTCGCCCTTGACAGCA	<i>spoIV</i>
spoIV_sg1_rv	AAACTGCTGTCAAGGGCGAAAGTG	
spoIV_sg2_fw	ACGCTTGAAGGAACGCCAAGTTAG	<i>spoIV</i>
spoIV_sg2_rv	AAACCTAACTTGGCGTTCCTCAA	
spo0A_sg1_fw	ACGCCGATGGTGGCAGATAAGCTG	<i>spo0A</i>
spo0A_sg1_rv	AAACCAGCTTATCTGCCACCATCG	
spo0A_sg2_fw	ACGCACACCGAGACCATCCAGGTG	<i>spo0A</i>
spo0A_sg2_rv	AAACCACCTGGATGGTCTCGGTGT	
sigF2_sg1_fw	ACGCGCACGACAGACCAGACGAGC	<i>sigF2</i>
sigF2_sg1_rv	AAACGCTCGTCTGGTCTGTCTGTC	
sigF2_sg2_fw	ACGCTCAGGTGCAGGTATCACGGC	<i>sigF2</i>
sigF2_sg2_rv	AAACGCCGTGATACCTGCACCTGA	
npr2_sg1_fw	ACGCAAGGTCCGGTGTAAAGCTGAGT	<i>npr2</i>
npr2_sg1_rv	AAACTCAGCTTACACCGACCTT	
npr2_sg2_fw	ACGCGATCACAGCAGCGCGTGC	<i>npr2</i>
npr2_sg2_rv	AAACACGCACGCGCTGCTGTGATC	
npr1_sg1_fw	ACGCCGCGGTGGAGAAGTTAGACG	<i>npr1+2</i>
npr1_sg1_rv	AAACCGTCTAACTTCTCCACCGCG	
npr1_sg2_fw	ACGCTCCTTGTGCCAGTAGATAGT	<i>npr1+2</i>
npr1_sg2_rv	AAACTATCTACTGGCACAAGGA	

Tabelle 8: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien

MATERIAL	BESCHREIBUNG	HERSTELLER
ALLGEMEINER LABORBEDARF		
Celluloseacetat-Membranfilter, Porengröße: 0,2 µm	Kreuzungsfilter bei der Konjugation, Filtration von Laufmitteln für die FPLC (versch. Durchmesser)	Sigma-Aldrich
Küvetten	Aus Polystyrol, Schichtdicke 10 mm, für OD600-Messungen bis OD600 = 1.	Sarstedt (Nümbrecht)
MiniPROTEAN TGX Precast Gels	Einsatzfertige Gele für die SDS-PAGE, verschiedene Ausführungen	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Nucleosid-Triphosphats	dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, für die PCR	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Petrischalen (94 x 16 mm)	Aus Polystyrol, steril, für Agarplatten	Greiner Bio-One (Frickhausen)
Pipet GripTips	Pipettenspitzen für Mehrkanalpipetten	INTEGRA Biosciences AG
Pipettenspitzen SurPhob	Spitzen für Kolbenhubpipetten	Biozym Scientific GmbH

primaPlate PCR-Platte mit Vollrand, 96well	Mikrotiterplatte für Enzymassays und Colony-PCR	Steibrenner Laborgeräte GmbH (Wiesebach)
PVDF Western Blotting Membran	Transfer-Membran für den Western Blot	Roche (Mannheim)
Rotilabo-Mikrotest-Platte, F-Profil	Mikrotiterplatte für photometrische Messungen	Carl Roth GmbH
Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm	Spritzenvorsatzfilter	Sartorius Stedim Biotech
Uvette	Küvetten für UV-VIS Spektroskopie (geeignet ab 220 nm), 2 mm bzw. 10 mm Schichtdicke	Thermo Fisher Scientific
Whatman Filterpapier Typ 1	Blätter, für den Western-Blot	GE Healthcare (Hamburg)
Whatman Filterpapier Typ 1 (Kreise, Durchmesser 15 cm)	Zum Replizieren von Kolonien auf frische Agarplatten	GE Healthcare
ANTIKÖRPER ETC.		
α-His ₆ (C-term)-AP	Monoklonaler Antikörper zum Nachweis von Fusionsproteinen mit C-terminalem His ₆ -tag, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP). Verwendeter Titer: 1: 2 000	Life Technologies (Carlsbad, USA)
α-NC	Polyklonaler Primärantikörper (aus Kaninchen) zum Nachweis von Komponenten des <i>H. thermocellum</i> -Cellulosoms. Verwendeter Titer: 1: 10 000	Thermo Fisher Scientific
α-Cel8A	Polyklonaler Primärantikörper (aus Kaninchen) zum Nachweis von Cel8A aus <i>H. thermocellum</i> . Verwendeter Titer: 1:100 000	Thermo Fisher Scientific
α-Rabbit IgG (Fc)-AP	Polyklonaler Sekundärantikörper (aus Ziege) zum Nachweis von Kaninchen-IgG, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP). Verwendeter Titer: 1:10 000	Promega
<i>Strep</i> -Tactin-AP	Streptavidinvariante zum spezifischen Nachweis von <i>Strep</i> -tag II Fusionsproteinen, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP). Verwendeter Titer: 1:4 000	IBA GmbH (Göttingen)
Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase	Chromogene Substratlösung für die Alkalische Phosphatase zum Sichtbarmachen von Banden im Western-Blot	Promega
ENZYME		
Phusion HF DNA Polymerase	Für die präparative PCR	New England Biolabs
<i>Bbs</i> I	Typ IIS-Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>Eag</i> I-HF	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>Mlu</i> I-HF	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>Spe</i> I	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>Xba</i> I-HF	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>Antarctic Phosphatase</i>	Phosphatase zur Dephosphorylierung linearisierter DNA (= Vermeidung von Religanden bei einfach geschnittenen Plasmiden)	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	DNA-Ligase	New England Biolabs
T4 Polynucleotidkinase	5'-Phosphorylierung von DNA für anschließende Ligierung	New England Biolabs

T7 DNA Ligase		DNA-Ligasase	New England Biolabs
PlasmidSafe DNase	ATP-dependent	DNase zum Abbau restlicher linearer DNA in Ligierungsansätzen	EpiCentre (Madison, USA)
Gibson Assembly Master Mix		Gebrauchsfertiger Reaktionsmix für das Gibson-Assembly	Thermo Fisher Scientific
MangoMix		Gebrauchsfertiger 2-fach Reaktionsmix für die Colony-PCR mit Referenzfarbstoff für die Elektrophorese	Bioline GmbH (Luckenwalde)
Lysozym		Für den Zellaufschluss bei der DNA-Isolierung	AppliChem GmbH
Proteinase K		Abbau von Proteinen bei der gDNA-Isolierung	AppliChem GmbH
Cel8A		Rekombinantes Cel8A von <i>H. thermocellum</i> , produziert in <i>E. coli</i> BL21 Star™	Zur Verfügung gestellt von Dr. Benedikt Leis und Patricia Krähe (Leis et al., 2017)
Cel9D		Rekombinantes Cel9D von <i>H. thermocellum</i> , produziert in <i>E. coli</i> BL21 Star™	Zur Verfügung gestellt von Dr. Benedikt Leis und Patricia Krähe (Leis et al., 2017)
Cel9R		Rekombinantes Cel9R von <i>H. thermocellum</i> , produziert in <i>E. coli</i> BL21 Star™	Zur Verfügung gestellt von Dr. Benedikt Leis und Patricia Krähe (Leis et al., 2017)
CipA6.2		Rekombinantes CipA6.2, produziert in <i>E. coli</i> BL21 Star™	Zur Verfügung gestellt von Dr. Benedikt Leis und Patricia Krähe
Xgh74A		Rekombinantes Xgh74A von <i>H. thermocellum</i> , produziert in <i>E. coli</i> BL21 Star™	Zur Verfügung gestellt von Dr. Benedikt Leis und Patricia Krähe
REFERENZEN FÜR DIE GELELEKTROPHORESE			
GeneRuler Mix		DNA-Referenz für die Agarosegelelektrophorese, Bereich: 100 bp bis 10 kbp	Thermo Fisher Scientific
Purple Gel Loading Dye		6x-Auftragspuffer für die Agarosegelelektrophorese	New England Biolabs
PageRuler Ladder	Prestained Protein	Vorgefärbter Größenstandard für die SDS-PAGE, Bereich: 10 - 180 kDa	Sartorius Stedim Biotech

2.3 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Übersicht verwendeter Nährmedien für die Kultivierung von Mikroorganismen. Sofern nicht anders angegeben, wurden feste Medien aus den jeweiligen Flüssigmedien durch Zugabe von 15 g/l Agar-Agar vor dem Autoklavieren hergestellt.

MEDIUM	ZUSAMMENSETZUNG	VERWENDUNGSZWECK
LB	10 g/l NaCl 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt	Standardmedium zur Kultivierung von Bazillen und <i>E. coli</i> (Bertani, 1951)
LB-G	LB-Medium mit 15 g/l Glycerin	Expressionsmedium für Bazillen
LB-S	LB-Medium mit 0,5 M Sorbit	Expressionsmedium für Bazillen
Magermilchagar	5 g/l Hefeextrakt 20 g/l Magermilchpulver 0,8 g/l Na-Citrat \times 2 H ₂ O	Indikatoragar zum Nachweis extrazellulärer Proteasen
Medium 0	5 g/l Sojapepton 20 g/l Glucose 4 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM Na/K-Phosphat-Puffer pH 7,6 0,5 g/l MgSO ₄ \times 7 H ₂ O 25 mg/l CaCl ₂ \times 2 H ₂ O 0,3% (v/v) Spurenelementlösung 0,03 mg/l Biotin	Ausgangsmedium für die Medienoptimierung
Medium 2	5 g/l Sojapepton 30 g/l Glucose 7 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 25 mM Na/K-Phosphat buffer pH 7,0 1 g/l MgSO ₄ \times 7 H ₂ O 15 mg/l CaCl ₂ \times 2 H ₂ O 0,06 % Spurenelementlösung	Bestes Expressionsmedium als Resultat der Medienoptimierung
MRS Agar	10 g/l Caseinpepton 10 g/l Fleischextrakt 4 g/l Hefeextrakt 20 g/l Glucose 2 g/l K ₂ HPO ₄ 1,08 g/l Tween 80 2 g/l (NH ₄) ₂ -Hydrogencitrat 5 g/l Natriumacetat 0,2 g/l MgSO ₄ \times 7 H ₂ O 0,04 g/l MnSO ₄ \times H ₂ O 14 g/l Agar-Agar	Vorgemischtes Pulver (Merck Katalognr. 1.10660.0500) zur Herstellung des MRS-Agars nach De Man et al. (1960)

MRS Bouillon	10 g/l Caseinpepton 8 g/l Fleischextrakt 4 g/l Hefeextrakt 20 g/l Glucose 2 g/l K ₂ HPO ₄ 1,0 g/l Tween 80 2 g/l (NH ₄) ₂ -Hydrogencitrat 5 g/l Natriumacetat 0,2 g/l MgSO ₄ 0,04 g/l MnSO ₄	Vorgemischtes Pulver (Merck Katalognr. 1.10661.0500) zur Herstellung der MRS-Bouillon nach De Man et al. (1960)
NB	5 g/l Pepton 3 g/l Fleischextrakt	Kulturmedium für ausgewählte Bazillen
NB-BBG	NB-Agar mit 0,1 % BBG	Indikatoragar zum Nachweis extrazellulärer β -Glucanasen mit Kongorot
NB-CMC	NB-Agar mit 0,1 % CMC	Indikatoragar zum Nachweis extrazellulärer Cellulasen mit Kongorot
NB-XG	NB-Agar mit 0,1 % XG	Indikatoragar zum Nachweis extrazellulärer Xyloglucanasen mit Kongorot
SM-Cas	17,5 g/l K ₂ HPO ₄ 7,5 g/l KH ₂ PO ₄ 5 g/l Glucose 4 g/l L-Glutamat 2 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,26 g/l Na ₃ -Citrat \times 2 H ₂ O 1 g/l Casamino Acids 250 mg/l MgSO ₄ 5,5 mg/l CaCl ₂ 1 mg/l MnCl ₂ \times 4 H ₂ O 1,7 mg/l ZnCl ₂ 0,33 mg/l CuCl ₂ \times 2 H ₂ O 0,6 mg/l CoCl ₂ \times 6 H ₂ O 0,6 mg/l Na ₂ MoO ₄ \times 2 H ₂ O 1,35 mg/l FeCl ₃ \times 6 H ₂ O	Medium ohne Autofluoreszenz zur Detektion der <i>sfGFP</i> -Fluoreszenz. Entwickelt basierend auf Spizizens Minimalmedium nach Michna et al. (2016) durch Hinzufügen der Casamino Acids
SOB	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,19 g/l KCl 0,58 g/l NaCl 2,4 g/l MgSO ₄	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>
SOC	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 3,6 g/l Glucose 0,19 g/l KCl	Regenerierung kompetenter <i>E. coli</i> nach der Transformation mit Plasmid-DNA
VM pH 5,7	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 125 mM Phosphat-Puffer pH 5,7: 1,08 g/l NaH ₂ PO ₄ 16,47 g/l Na ₂ HPO ₄	phosphatgepuffertes Vollmedium zur Expression in Bazillen, pH 5,7

VM pH 7,0	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt, 125 mM Phosphat-Puffer pH 7,0: 9,12 g/l NaH ₂ PO ₄ 10,79 g/l Na ₂ HPO ₄	phosphatgepuffertes Vollemdium zur Expression in Bazillen, pH 7,0
XG-Topagar	7 g/l Agar-Agar 1 g/l XG 100 ml/l 10x MOPS-Puffer pH 6,5	Topagar mit Xyloglucan zur Durchmusterung der SP-Bibliotheken für <i>xgh74A</i>

Tabelle 10: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen

PUFFER / LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG	VERWENDUNGSZWECK
ENZYMAKTIVITÄTSTESTS		
2× NaAc pH 5,0	200 mM Na-Acetat 100 mM NaCl 20 mM CaCl ₂ pH 5,0 bei 60 °C	2× Reaktionspuffer für Cel8A und die Herstellung des Azo-CMC-Reagenz
10× MOPS pH 6,5	1 M MOPS 100 mM CaCl ₂ 500 mM NaCl pH 6,5 bei 60 °C	10× Reaktionspuffer für Cel9D, Cel9R und Xgh74A
Azo-CMC Reagenz	20 g/l Azo-CMC gelöst 2× NaAc pH 5,0	Chromogenes Substrat zur Quantifizierung der CMCase-Aktivität
Präzipitationspuffer	294 mM Na-Acetat × 3 H ₂ O, pH 5,0 (HCl) 22 mM Zn-Acetat 80 % (v/v) Ethanol	Ausfällen von polymerem Substrat nach der Reaktion beim Azo-CMC-Test
Substratlösungen	1 % (w/v) Substrat (BBG, CMC oder XG) 0,02 % (w/v) NaN ₃	Substratlösung zur Messung der Enzymaktivität mittels des DNSA-Tests
DNSA-Reagenz	10 g/l 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA) 10 g/l NaOH 200 g/l Kalium-Natrium-Tartrat 0,5 g/l NaSO ₄ 2,0 g/l Phenol filtriert durch einen Faltenfilter und in einer Braunglasflasche lichtgeschützt bei 4 °C gelagert	Nachweis reduzierender Zucker bei Enzymaktivitätstests
PROTEINANALYTIK		
Trenngel-Puffer	500 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS	Puffer für die Herstellung von Trenngelen für die SDS-PAGE. Bei der Nativ-PAGE wird kein SDS zugegeben
Sammelgel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS	Puffer für die Herstellung von Sammelgelen für die SDS-PAGE. Bei der Nativ-PAGE wird kein SDS zugegeben

10× Laufpuffer (SDS-PAGE)	250 mM Tris/HCl, pH 8,8 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS	10× Stammlösung zur Herstellung des Laufpuffers für die SDS-PAGE. Bei der Nativ-PAGE wird kein SDS zugegeben
Transferpuffer	5,8 g/l Tris 2,9 g/l Glycin 0,37 g/l SDS 20 % (v/v) Methanol	Transferpuffer für den Westernblot
10× PBS, pH 7,4	1,37 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄	Waschen von Westernblot-Membranen (10× Stammlösung)
PBS-T	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20	Waschen von Westernblot-Membranen
4 x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris/HCl, pH 6,8 40 % (w/v) Glycerin 8,4 % (w/v) SDS 570 mM β-Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau	Probenauftragspuffer für die SDS-PAGE. Auftragspuffer für die native PAGE wird ohne β-Mercaptoethanol und SDS erstellt.
Coomassie Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brillantblau G-250 45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure	Färbelösung für SDS-Gele
Coomassie Entfärber	45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure	Entfärbelösung für SDS-Gele
GeFi-Puffer	50 mM MOPS, pH 7,0 500 mM NaCl 10 mM CaCl ₂	Komplexierung von Cel8A mit CipA6.2
PROTEINREINIGUNG MITTELS IMAC		
IMAC Laufpuffer	50 mM MOPS, pH 7,3 0,3 M NaCl 20 mM Imidazol 20 mM CaCl ₂	sterilfiltrierter Laufpuffer für die IMAC
IMAC Elutionspuffer	50 mM MOPS, pH 7,3 0,1 M NaCl 0,5 M Imidazol 5 mM CaCl ₂	sterilfiltrierter Elutionspuffer für die IMAC
IMAC Stripping-Puffer	50 mM MOPS pH 7,3 0,1 M NaCl 50 mM EDTA	Regenerierung von His-Trap-FF-Säulchen für die IMAC
IMAC Recharging-Puffer	100 mM NiSO ₄	Regenerierung von His-Trap-FF-Säulchen für die IMAC
WEITERE PUFFER UND LÖSUNGEN		
50× TAE-Puffer	2 M Tris/Acetat, pH 8,0 50 mM EDTA, pH 8,0	50× Puffer-Stammlösung für die Herstellung von Agarosegelen und des Laufpuffers für die Agarosegelelektrophorese

CCMB80	10 mM K-Acetat 80 mM CaCl ₂ 10 mM MgCl ₂ 20 mM MnCl ₂ 10 % (w/v) Glycerin	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>
Spurenelementlösung	0,4 g/L FeSO ₄ 5,0 g/L MnCl ₂ × 4 H ₂ O 0,1 g/L ZnSO ₄ × 7 H ₂ O 0,8 g/L H ₃ BO ₃ 0,04 g/L CuSO ₄ × 5 H ₂ O 0,04 g/L Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O 0,08 g/L Co(NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O	Für die Medien der Medienoptimierung

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 11: Verwendete *E. coli*-Stämme. DSMZ: Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

STAMM	BESCHREIBUNG	QUELLE
<i>E. coli</i> DH10β	Genotyp: F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λrpsL nupG</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> TOP10	Genotyp: F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> Stellar™	Genotyp: F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169, Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , λ-	Clontech Laboratories
<i>E. coli</i> HB101 pRK2013 (DSMZ 5599)	Stamm K12 HB101, mit Helferplasmid pRK2013 für mobilisierbare Plasmide: Replicon ColE1, Tn903, RK2 Transferegene.	DSMZ, Figurski & Helinski, 1979

Tabelle 12: Verwendete Bazillen. DSMZ: Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, WL: Lehrstuhl für Mikrobiologie (Prof. Liebl), Technische Universität München, Freising-Weihenstephan. WS: Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie (Prof. Scherer), Technische Universität München, Freising-Weihenstephan.

STAMM	BESCHREIBUNG	QUELLE
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WL
<i>B.adius</i> DSM 23 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WL
<i>B. bataviensis</i> WS4576	Wildisolat	Stammsammlung WS
<i>B. clausii</i> DSM 8716 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WL
<i>B. cohnii</i> DSM 6307 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WS
<i>B. flexus</i> DSM 1320 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WS
<i>B. foraminis</i> DSM 19613 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WS
<i>B. ginsengihumi</i> WS8095	Wildisolat	Stammsammlung WS
<i>B. horikoshii</i> WS2157	Wildisolat	Stammsammlung WS
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WL
<i>B. megaterium</i> DSM 32 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WL
<i>B. mojavensis</i> DSM 9205 ^T	Typstamm	Stammsammlung WS
<i>B. mycoides</i> DSM 2048 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WL
<i>B. niabensis</i> WS9147	Wildisolat	Stammsammlung WS
<i>B. niacini</i> WS4575	Wildisolat	Stammsammlung WS
<i>B. oleronius</i> WS8036	Wildisolat	Stammsammlung WS
<i>B. pocheonensis</i> DSM 18135 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WS
<i>B. pseudomycoides</i> DSM 12442 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WS
<i>B. pumilus</i> DSM 27 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WS
<i>B. sonorensis</i> DSM 13779 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WS

<i>B. subtilis</i> RIK1285	Expressionsstamm, abgeleitet von Marburg 168, Genotyp: <i>trpC2</i> , <i>lys1</i> , <i>aprE</i> Δ 3, <i>nprR2</i> , <i>nprE18</i>	TaKaRa-Bio Inc.
<i>B. thuringiensis</i> DSM 2046 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WL
<i>B. vallismortis</i> DSM 11031 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WS
<i>Fictibacillus arsenicus</i> WS4538	Wildisolat	Stammsammlung WS
<i>P. polymyxa</i> DSM 292		DSMZ, Stammsammlung WL
<i>P. polymyxa</i> DSM 356		DSMZ, Stammsammlung WL
<i>P. polymyxa</i> DSM 365		DSMZ, Stammsammlung WL
<i>P. polymyxa</i> DSM 36 ^T	Typstamm	DSMZ, Stammsammlung WL

Tabelle 13: Milchsäurebildene Bakterien des Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB), Potsdam. Siehe auch Tabelle 30.

STAMM	BESCHREIBUNG	QUELLE
<i>B. coagulans</i> A59	Wildisolat	Stammsammlung ATB
<i>B. coagulans</i> A203	Wildisolat	Stammsammlung ATB
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> A159	Wildisolat	Stammsammlung ATB
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> A160	Wildisolat	Stammsammlung ATB
<i>Lactococcus lactis</i> A38	Wildisolat	Stammsammlung ATB
<i>Lactococcus lactis</i> A55	Wildisolat	Stammsammlung ATB

Tabelle 14: Plasmide als Klonierungsvorlagen

PLASMID	BESCHREIBUNG	QUELLE
pBE-S	Ausgangsplasmid für die Erstellung von pBACOV	Takara-Bio Inc.
pKVM4	Shuttlevektor zur Gendelektion mittels des <i>codAB</i> -Systems. Vorlage für die Klonierung von <i>oriT/traJ</i>	Dr. David Kostner (Kostner et al., 2017)
pHIS1525	Vorlage für die Klonierung von P _{<i>xylA</i>} und P _{<i>XylA+</i>}	Mobitec GmbH, Göttingen
pET28A- <i>sfGFP</i>	Vorlage für die Klonierung von <i>sfGFP</i>	Dr. Mark Teese (Schanzenbach et al., 2017)
pDel2	Derivat von pKVM4. Homologe Flanken für das Zielgen <i>spoIV</i> kloniert mittels Primer Gibson_ObereFlanke_fw, Gibson_Obere-Flanke_rv, Gibson_Untere-Flanke_fw, Gibson_untere-Flanke_rv	Diese Arbeit
pDel3	Derivat von pKVM4. Homologe Flanken für das Zielgen <i>spo0A</i> kloniert mittels Primer Gibson-OF-Spo0A-fw, Gibson-OF-Spo0A-rv, Gibson-UF-Spo0A-fw, Gibson-UF-Spo0A-rv	Diese Arbeit
pDel4	Derivat von pKVM4. Homologe Flanken für das Zielgen <i>sigF2</i> kloniert mittels Primer Gibson-OF-sigF2-fw, Gibson-OF-sigF2-rv, Gibson-UF-sigF2-fw, Gibson-UF-sigF2-rv	Diese Arbeit
pDel7	Derivat von pKVM4. Homologe Flanken für das Zielgen <i>npr2</i> kloniert mittels Primer Gibson-OF-	Diese Arbeit

pDel8	npr2-fw, Gibson-OF-npr2-rv, Gibson-UF-npr2-fw, Gibson-UF-npr2-rv Derivat von pKVM4. Homologe Flanken für das Zieloperon <i>npr1+2</i> kloniert mittels Primer Gibson_OF_npr2_fw, Gibson-OF-npr1-rv, Gibson-UF-npr1-fw, Gibson-UF-npr1-rv	Diese Arbeit
-------	---	--------------

Tabelle 15: Mobilisierbare Expressionsplasmide für die Anwendung in Bazillen.

NAME	BESCHREIBUNG	QUELLE
pBACOV	Leervektor. Mobilisierbares Plasmid mit breitem Wirtsspektrum, enthält P_{aprE} und SP_{aprE} aus <i>B. subtilis</i> zur sekretorischen Expression heterologer Gene in Bazillen. Ausgangsplasmid für alle weiteren Plasmide dieser Arbeit	Diese Arbeit
pBACOV- <i>sfGFP</i>	Mobilisierbares Plasmid für die intrazelluläre Expression von <i>sfGFP</i> in Bazillen	Diese Arbeit
pBACOV- <i>cel8A</i>	Synthetisierte Version von <i>cel8A</i> aus <i>H. thermocellum</i> , kodon-optimiert für <i>B. megaterium</i>	Diese Arbeit, Gensynthese durch Eurofins Genomics, Ebersberg
pBACOV- <i>cel9D</i>	Synthetisierte Version von <i>cel9D</i> aus <i>H. thermocellum</i> , kodon-optimiert für <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit, Gensynthese durch Eurofins Genomics
pBACOV- <i>cel9R</i>	Synthetisierte Version von <i>cel9R</i> aus <i>H. thermocellum</i> , kodon-optimiert für <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit, Gensynthese durch Eurofins Genomics
pBACOV- <i>xgh74A</i>	Synthetisierte Version von <i>xgh74A</i> aus <i>H. thermocellum</i> , kodon-optimiert für <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit, Gensynthese durch Eurofins Genomics

Tabelle 16: Plasmide mit optimierten SP zur sekretorischen Produktion von Cel8A, Cel9D, Cel9R bzw. Xgh74A. Die SP wurden experimentell mittels Durchmusterung von SP-Bibliotheken ermittelt.

NAME	BESCHREIBUNG	QUELLE
pBACOV-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	SP _{aprE} ersetzt durch SP _{lipB}	Diese Arbeit
pBACOV-SP _{yoIC} - <i>cel9D</i>	SP _{aprE} ersetzt durch SP _{yoIC}	Diese Arbeit
pBACOV-SP _{glpQ} - <i>cel9D</i>	SP _{aprE} ersetzt durch SP _{glpQ}	Diese Arbeit
pBACOV-SP _{ydjM} - <i>cel9D</i>	SP _{aprE} ersetzt durch SP _{ydjM}	Diese Arbeit
pBACOV-SP _{lytF} - <i>cel9R</i>	SP _{aprE} ersetzt durch SP _{lytF}	Diese Arbeit
pBACOV-SP _{citH} - <i>cel9R</i>	SP _{aprE} ersetzt durch SP _{citH}	Diese Arbeit

Tabelle 17: Plasmide zur Untersuchung alternativer Promotoren zur sekretorischen Produktion von Cel8A.

NAME	BESCHREIBUNG	QUELLE
pPxylA- <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pPxylA+- <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP43- <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pPtmQ- <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit

pPylb- <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP43P- <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP01680-SP _{<i>lipB</i>} - <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP01680-SP _{<i>nat</i>} - <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP02218-SP _{<i>lipB</i>} - <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP02218-SP _{<i>nat</i>} - <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP03468-SP _{<i>lipB</i>} - <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP03468-SP _{<i>nat</i>} - <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP04737-SP _{<i>lipB</i>} - <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit
pP04737-SP _{<i>nat</i>} - <i>cel8A</i>	Siehe Tabelle 42	Diese Arbeit

Tabelle 18: Plasmide zur Erzeugung von Gendelektionen mittels CRISPR/Cas9

NAME	BESCHREIBUNG	QUELLE
pCasPP	Leervektor für die Klonierung von CRISPR/Cas9-Deletionsvektoren	Rütering et al. (2017)
pCasPP- <i>pepC</i>	Deletion von <i>pepC</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 365	Christoph Schilling, Lehrstuhl für Chemie biogener Rohstoffe, Prof. Sieber, TUM
pCasPP- <i>pepQ</i>	Deletion von <i>pepQ</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 365	Christoph Schilling, Lehrstuhl für Chemie biogener Rohstoffe, Prof. Sieber, TUM
pCasPP- <i>sg1-spoIV</i>	Deletion von <i>spoIV</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 1 der sgRNA (Primer <i>spoIV-sg1-fw</i> und <i>spoIV-sg1-rv</i>), homologe Flanken umkloniert aus pDel2	Diese Arbeit
pCasPP- <i>sg2-spoIV</i>	Deletion von <i>spoIV</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 2 der sgRNA (Primer <i>spoIV-sg2-fw</i> und <i>spoIV-sg2-rv</i>), homologe Flanken umkloniert aus pDel2	Diese Arbeit
pCasPP- <i>sg1-spo0A</i>	Deletion von <i>spo0A</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 1 der sgRNA (Primer <i>spo0A-sg1-fw</i> und <i>spo0A-sg1-rv</i>), homologe Flanken umkloniert aus pDel3	Diese Arbeit
pCasPP- <i>sg2-spo0A</i>	Deletion von <i>spo0A</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 2 der sgRNA (Primer <i>spo0A-sg2-fw</i> und <i>spo0A-sg2-rv</i>), homologe Flanken umkloniert aus pDel3	Diese Arbeit
pCasPP- <i>sg1-sigF2</i>	Deletion von <i>sigF2</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 1 der sgRNA (Primer <i>sigF2-sg1-fw</i> und <i>sigF2-sg1-rv</i>), homologe Flanken umkloniert aus pDel4	Diese Arbeit
pCasPP- <i>sg2-sigF2</i>	Deletion von <i>sigF2</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 2 der sgRNA (Primer <i>sigF2-sg2-fw</i> und <i>sigF2-sg2-rv</i>), homologe Flanken umkloniert aus pDel4	Diese Arbeit

pCasPP-sg1- <i>npr2</i>	Deletion von <i>npr2</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 1 der sgRNA (Primer <i>npr2</i> -sg1-fw und <i>npr2</i> -sg1-rv), homologe Flanken umklontiert aus pDel7	Diese Arbeit
pCasPP-sg2- <i>npr2</i>	Deletion von <i>npr2</i> in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 2 der sgRNA (Primer <i>npr2</i> -sg2-fw und <i>npr2</i> -sg2-rv), homologe Flanken umklontiert aus pDel7	Diese Arbeit
pCasPP-sg1- <i>npr1</i> +2	Deletion von <i>npr1</i> +2 in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 1 der sgRNA (Primer <i>npr1</i> -sg1-fw und <i>npr1</i> -sg1-rv), homologe Flanken umklontiert aus pDel8	Diese Arbeit
pCasPP-sg2- <i>npr1</i> +2	Deletion von <i>npr1</i> +2 in <i>P. polymyxa</i> DSM 292, Variante 2 der sgRNA (Primer <i>npr1</i> -sg2-fw und <i>npr1</i> -sg2-rv), homologe Flanken umklontiert aus pDel8	Diese Arbeit

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von *E. coli* und Bazillen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Bakterienstämme in 100 ml Erlenmeyerkölbchen mit 20 ml flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C kultiviert, wobei Flüssigkulturen bei 180 rpm geschüttelt wurden. *B. mycooides* wurde bei 30 °C inkubiert.

Vorkulturen für Expressionsversuche mit Bazillen sowie Flüssigkulturen für Klonierungszwecke wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten angeimpft und über Nacht inkubiert. Hauptkulturen für Expressionsversuche wurden ausgehend von Vorkulturen auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und für 24 h inkubiert.

Um vorhandene Plasmide in den Zellen zu erhalten, wurde mittels geeigneter Antibiotika ein Selektionsdruck erzeugt. Entsprechend wurde *E. coli* HB101 pRK2013 mit 50 µg/ml Kanamycin (Kan) kultiviert, für die Klonierungsstämme von *E. coli* (DH10β, TOP10 und Stellar™) wurde nach der Transformation 100 µg/ml Carbenicillin verwendet. *Bacillus*-Transkonjuganten wurden auf LB-Selektionsplatten mit Polymyxin B (Pol) und Kan bzw. in flüssigem LB-Medium mit Kan kultiviert. Die hierfür verwendeten Antibiotikakonzentrationen sind in Kapitel 3.1.3 bzw. Tabelle 29 dargestellt.

Bewachsene Agarplatten wurden in der Regel bis zu 14 Tage bei 4 °C gelagert und zum Animpfen frischer Kulturen verwendet. Im Gegensatz dazu wurden Platten mit *P. polymyxa* nur für 7 Tage bei 4 °C gelagert, da Kolonien von älteren Platten nicht mehr reproduzierbar anwachsen.

Zur Durchmusterung der SP-Bibliotheken wurden Deep-Well-Blöcke verwendet. In jeder der 96 Kavitäten wurden 900 µl Medium gefüllt. Zum Animpfen wurden Einzelkolonien mittels Zahnstocher in die Kavitäten übertragen. Dabei wurden die Zahnstocher in den Kavitäten stehen gelassen, bis der gesamte Block angeimpft war. So war eindeutig zu erkennen, welche Kavitäten bereits angeimpft waren. Anschließend wurden die Blöcke mit sterilen, luftdurchlässigen Folien (AeraSeal, Excel Scientific, Inc., Victorville, USA)

verschlossen und bei 37 °C, 375 rpm inkubiert.

2.5.2 Kultivierung von milchsäurebildenden Bakterien

Die milchsäurebildenden Bakterien des ATB-Potsdam (siehe Tabelle 13) wurden in MRS-Medium kultiviert (De Man et al., 1960). Die verwendeten Wachstumsbedingungen sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Inkubationsdauer betrug 48 h. Flüssigkulturen von *L. delbrueckii* und *L. lactis* wurden nicht geschüttelt, da es sich um mikroaerophile Stämme handelt. Agarplatten der milchsäurebildenden Bakterien wurden nicht bei 4 °C gelagert; zum Animpfen neuer Kulturen wurden entweder frisch bewachsene Agarplatten oder Flüssigkulturen (alternativ: Kryokulturen) verwendet.

Tabelle 19: Wachstumsbedingungen der milchsäurebildenden Bakterien des ATB Potsdam. Sofern nicht anders angegeben, wurde die **fett** gedruckte Wachstumstemperatur verwendet.

STAMM	WACHSTUMSBEDINGUNGEN	
	GEEIGNETE TEMPERATUREN	SCHÜTTELN (FLÜSSIGKULTUREN)
<i>B. coagulans</i> A59	37 °C, 45 °C, 52 °C	180 rpm
<i>B. coagulans</i> A203	37 °C, 45 °C, 52 °C	180 rpm
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> A159	37 °C, 45 °C, 52 °C	0 rpm
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> A160	37 °C, 45 °C, 52 °C	0 rpm
<i>Lactococcus lactis</i> A38	30 °C	0 rpm
<i>Lactococcus lactis</i> A55	30 °C	0 rpm

2.5.3 Kryokonservierung

Um wichtige Stämme oder Klone langfristig zu konservieren, wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen 800 µl einer frischen über-Nacht-Kultur mit 200 µl sterilem Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert. Um einen Stamm von einer Kryokultur zu reaktivieren, wurde mit einer Impföse ein Stückchen des gefrorenen Materials entnommen und per Vereinzlungsausstrich auf eine geeignete Agarplatte ausgebracht. Diese Platte wurde anschließend unter geeigneten Bedingungen inkubiert, um Kolonien zu erhalten.

2.5.4 Techniken zur Replikation von Kolonien auf frische Agarplatten

Nach Erzeugung von SP-Bibliotheken (siehe Kapitel 2.6.8) und deren Transfer in *E. coli* Stellar™ wurden die erhaltenen Kolonien mittels Stempeltechnik auf frische Agarplatten übertragen. Dies diente dazu, ein Rückhaltemuster der SP-Bibliothek in *E. coli* zu erzeugen, um ggf. den Transfer in *P. polymyxa* DSM 292 wiederholen zu können.

Bei der Stempeltechnik wurde ein runder Plastikstempel, dessen Durchmesser dem Innendurchmesser einer Agarplatte entsprach, mit einer Whatman-Filterpapierscheibe bespannt. Anschließend wurde der Stempel fest auf die bewachsene Agarplatte gedrückt, um die Kolonien auf das Filterpapier zu übertragen. Nun wurde der Stempel leicht auf eine frische LB_{Carb100}-Platte gedrückt und so die Kolonien auf die frische Platte repliziert. Die Platte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das restliche an dem Filterpapier anheftende Zellmaterial wurde mittels Pipettenspitzen abgeschabt und zum Animpfen der Donorkultur für die triparentale Konjugation (siehe Kapitel 2.6.15) verwendet.

Um nach der Durchmusterung der SP-Bibliotheken in *P. polymyxa* DSM 292 die besten Klone für weitere Versuche (Expressionsversuche, Identifikation der SP) verfügbar zu halten, wurden die gewachsenen Klone aus den Deepwell-Blöcken auf frische Selektionsagarplatten repliziert. Dazu wurde ein Metallkamm mit 6 × 8 Zähnen im Abstand von 9 mm in eine Hälfte des bewachsenen Deepwell-Blocks getaucht, sodass die Zahnspitzen mit Flüssigkultur benetzt waren. Diese wurden dann auf eine frische Selektionsplatte getupft. Dabei war es entscheidend, die Orientierung auf der Agarplatte

zu kennzeichnen, sodass die Kolonien später der Well-Position im Deepwell-Block zugeordnet werden konnten. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte bei 37 °C über Nacht. Auf diese Weise wurden alle 96 Klone eines Deepwell-Blocks auf insgesamt zwei Agarplatten übertragen.

2.5.5 Photometrische Messung des Wachstums sowie der Zelldichte

Um das Wachstum sowie die Zelldichte von Flüssigkulturen zu ermitteln, wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Zur Messung wurde ein Spektralphotometer (BioSpectrometer Fluorescence, Eppendorf) verwendet, als Blank diente frisches Kulturmedium. Lag die erwartete OD_{600} unter 1,0, so wurden 800 μ l Kultur in Standard-Küvetten oder 200 μ l Kultur in UVetten (Eppendorf) pipettiert und die OD_{600} bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen (BioSpectrometer Fluorescence, Eppendorf). Die UVette ist so konstruiert, dass sie je nach Positionierung im Photometer eine Schichtdicke von 10 mm oder 2 mm aufweist. Bei einer erwarteten OD_{600} zwischen 1,0 und 5,0 wurden 200 μ l unverdünnte Kultur in UVetten gegeben und bei einer Schichtdicke von 2 mm gemessen. Das Spektralphotometer wurde so programmiert, dass die Schichtdicke bei der Angabe des Endergebnisses bereits mit eingerechnet wurde. Lag die OD_{600} über 5,0, wurde die Kultur direkt in der UVette mit frischem Medium 1:2 verdünnt und bei einer Schichtdicke von 2 mm gemessen. Das Photometer wurde so programmiert, dass die Schichtdicke und der Verdünnungsfaktor bei der Angabe des Endergebnisses bereits mit eingerechnet wurden. Gegebenenfalls wurden weitere Verdünnungsschritte durchgeführt, sodass der Rohwert $\leq 1,0$ war, um die Messung im linearen Bereich des Photometers durchzuführen.

2.5.6 Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Kanamycin und Polymyxin B

Um für jeden *Bacillus*-Empfängerstamm geeignete Selektionsbedingungen für den Plasmidtransfer herauszufinden, wurden jeweils die minimalen Hemmkonzentrationen von Kan und Pol ermittelt. Dazu wurde der Reihenverdünnungstest verwendet (Abbildung 3).

Eine einzelne Kolonie des entsprechenden Wildtyp-Stammes wurde vorsichtig und gleichmäßig in 20 ml LB resuspendiert. 4 Reagenzgläser wurden mit jeweils 2,5 ml dieser Suspension befüllt, während ein fünftes Reagenzglas mit 5 ml befüllt wurde. Die 5 ml-Kultur wurde mit Kan (Endkonzentration: 200 µg/ml) oder Pol (Endkonzentration: 40 µg/ml) versetzt.

Nun wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, indem jeweils 2,5 ml von einem Reagenzglas zum nächsten überführt wurden. Somit wurde das enthaltene Antibiotikum mit jedem Schritt 2-fach verdünnt (Kan: 200 µg/ml bis 12,5 µg/ml; Pol: 40 µg/ml bis 2,5 µg/ml). Die Reagenzgläser wurden über Nacht bei 180 rpm bei der Wachstumstemperatur des jeweiligen Stammes inkubiert. Die MHK war die niedrigste Konzentration, bei der der jeweilige Stamm kein Wachstum mehr zeigte.

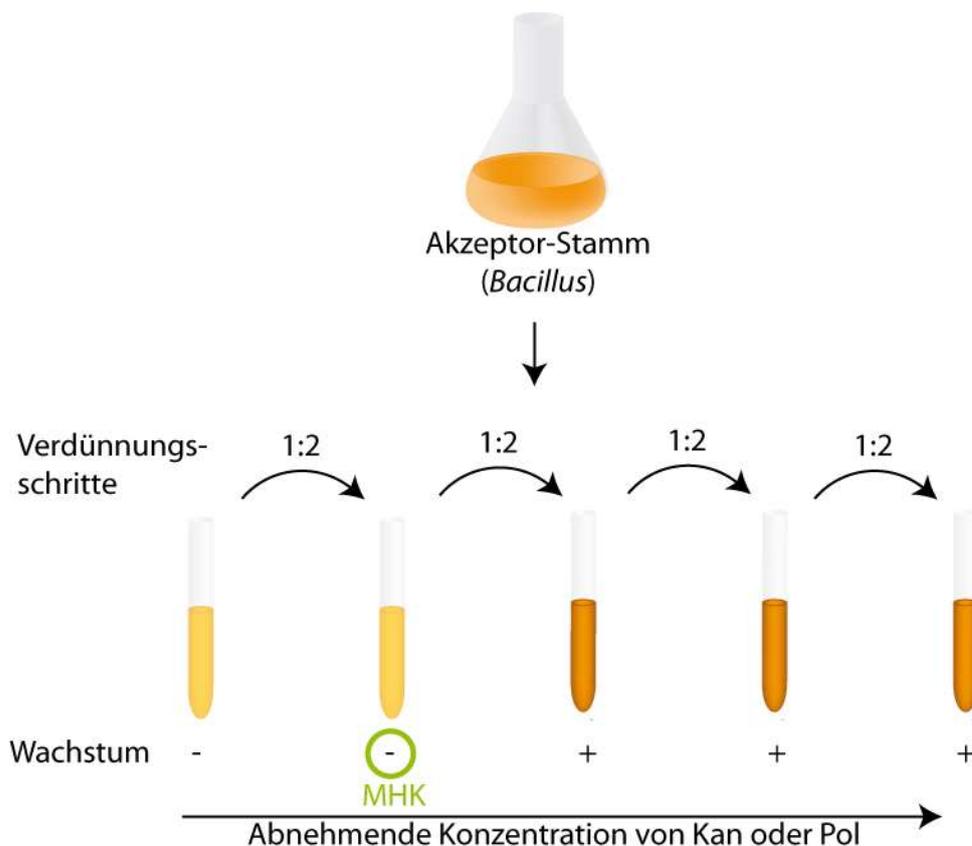


Abbildung 3: Der Reihenverdünnungstest zur Ermittlung der MHK verschiedener Antibiotika.

2.5.7 Nachweis extrazellulärer Wirtshydrolasen mittels Indikatormedien

Um die Bildung extrazellulärer Wirtsenzyme mit Hydrolaseaktivität zu untersuchen, wurden Indikatormedien verwendet. Die zu untersuchenden Stämme wurden per Verdünnungsausstrich auf die Indikatorplatten ausgebracht und für 24 h bei der jeweiligen Wachstumstemperatur inkubiert. Das Nährmedium dieser Agarplatten enthält ein geeignetes Substrat, das durch die nachzuweisende Hydrolase abgebaut wird. Dadurch entstehen um die Kolonie herum sichtbare Höfe, anhand derer die Hydrolaseaktivität nachgewiesen werden kann.

Zum Nachweis extrazellulärer Proteasen wurde Magermilchagar verwendet (siehe Kapitel 2.3). Dieser Agar ist durch das enthaltene Magermilchpulver trüb. Werden die Milchproteine abgebaut, entstehen sichtbare, klare Höfe um die Kolonien.

Zum Nachweis extrazellulärer Glycosidhydrolasen wurde NB-Agar mit 0,1 % Xyloglucan (XG), Gersten- β -Glucan (BBG) oder Carboxymethylcellulose (CMC) verwendet (siehe Kapitel 2.3). Diese löslichen Substrate sind im Medium nicht selbst sichtbar, können aber mit einer Kongorot-Lösung (0,1 % w/v) angefärbt werden (Teather & Wood, 1982). Dazu wurden die bewachsenen Platten mit der Kongorot-Lösung überschichtet. Nach einer Einwirkzeit von wenigen Minuten wurde die Kongorot-Lösung vorsichtig abgegossen und die Platten zweimal mit 1 M NaCl gewaschen. Das Kongorot färbt die Polysaccharide rot. Wurden die Polysaccharide durch extrazelluläre Glycosidhydrolasen abgebaut, entstehen um die Kolonien herum helle, gelblich-weiße Höfe, die die Enzymaktivität anzeigen.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Erstellung von SP-Bibliotheken wurden gekaufte, chemisch kompetente *E. coli* Stellar™-Zellen verwendet, um eine möglichst optimale Transformationseffizienz zu gewährleisten. Für andere Klonierungsarbeiten wurden selbst hergestellte, chemisch kompetente Zellen der Klonierungsstämme *E. coli* DH10β oder TOP10 verwendet.

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme nach Hanahan et al. (1991) wurden 3 ml einer Übernacht-Kultur zum Animpfen von 250 ml SOB Medium verwendet. Diese Hauptkultur wurde bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Sobald die OD₆₀₀ 0,3 erreicht hatte, wurden die Zellen durch Zentrifugation (3 000 g, 10 min, 4 °C) geerntet. Alle weiteren Schritte wurden behutsam und auf Eis durchgeführt, um die empfindlichen Zellen nicht zu schädigen. Das Zellpellet wurde in 80 ml eisgekühlten CCMB80-Puffer (Tabelle 10) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (3 000 g, 10 min, 4 °C). Nun wurden die Zellen in 10 ml eisgekühltem CCMB80-Puffer resuspendiert und zu je 50 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* wurde nach Hanahan et al. (1991) durchgeführt. Ein 50 µl-Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde auf Eis aufgetaut. Sofern nicht anders angegeben, wurde 1 µl Plasmid-DNA hinzugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges Anschnippen gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 90 s. Anschließend wurden sofort 500 µl SOC-Medium (vorgewärmt auf 37 °C) hinzugegeben. Zur Regeneration der Zellen wurde der Ansatz für 45 min bei 37 °C und 800 rpm im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 50 µl auf einer LB-Platte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Der Rest des Ansatzes wurde für 1 min bei 4 000 rpm abzentrifugiert, im Rücklauf resuspendiert und ebenfalls

ausplattiert. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 37 °C oder für 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

2.6.3 Präparative und analytische Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient zur Vervielfältigung eines Ziel-DNA-Fragments (Mullis & Faloona, 1987). Dabei kommen sequenzspezifische Primer zum Einsatz, die der DNA-Polymerase als Anfangspunkt dienen. Die Reaktion läuft zyklisch ab, wobei in jedem Zyklus zuerst die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen wird. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an die Zielsequenz eines DNA-Einzelstranges an (*annealing*), woraufhin im dritten Schritt die Synthese des Tochterstranges erfolgt. Die einzelnen Schritte werden durch ein Temperaturprofil gesteuert, das abhängig von der gewählten DNA-Polymerase, den Eigenschaften der Primer und der Länge der Zielsequenz ist.

Die präparative PCR wurde verwendet, um DNA-Fragmente (z. B. Gene, Promotoren oder Bestandteile von Plasmid-Rückgraten) für Klonierungszwecke oder für die Sequenzierung zu vervielfältigen. Bei der präparativen PCR ist höchste Präzision wichtig, um Punktmutationen im Produkt zu vermeiden. Deswegen wurde hierfür die Phusion HF DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (*proof reading*) verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprofil sind in Tabelle 20 dargestellt. Bei der Negativkontrolle wurde keine Vorlagen-DNA eingesetzt. Ein entscheidender Punkt für eine erfolgreiche präparative PCR ist die Wahl der richtigen Annealing-Temperatur. Hierbei wurde zunächst eine Temperatur von 2 °C über der T_m des Primers mit der niedrigeren T_m gewählt. Sofern dies keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte, wurden zunächst in einem Vorversuch mittels Gradienten-PCR im 5 µl-Maßstab verschiedene Annealing-Temperaturen von 52 °C bis 72 °C ausgetestet, um die beste Annealing-Temperatur zu finden. Nach der PCR wurden zunächst 5 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl 6x-Auftragspuffer gemischt und mittels analytischer Agarosegelelektrophorese untersucht. Vor der weiteren Verwendung (Sequenzierung oder Klonierung) wurde das PCR-Produkt mit dem MinElute PCR Purification Kit nach Herstellerprotokoll gereinigt. Der finale Elutionsschritt wurde abweichend vom Herstellerprotokoll wie folgt durchgeführt: Statt Elutionspuffer wurde auf 60 °C

vorgewärmtes ddH₂O verwendet. Nach Zugabe des ddH₂O wurde das Säulchen für 5 min bei 60 °C inkubiert, um die Ausbeute an gereinigter DNA zu erhöhen, bevor abzentrifugiert wurde.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil bei der preparativen PCR.

ZUSAMMENSETZUNG DES REAKTIONSANSATZES		
BESTANDTEIL	VOLUMEN	ENDKONZENTRATION
Vorlagen-DNA	Abhängig von der Konzentration: 2 pg – 20 ng Plasmid-DNA 100 – 500 ng gDNA	Bis zu 500 ng/100 µl Ansatz
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	2.6 µl	260 µM je dNTP
fw-Primer (10 µM)	5 µl	0,5 µM
rv-Primer (10 µM)	5 µl	0,5 µM
Phusion HF DNA-Polymerase (2 U/µl)	1 µl	2 U/100 µl Ansatz
Phusion HF-Puffer (5x)	20 µl	1x
ddH ₂ O	ad 100 µl	-
TEMPERATURPROFIL		
SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT
Deckeltemperatur	110 °C	Während des gesamten Laufs
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min
35 Zyklen, bestehend aus:		
Denaturierung	98 °C	15 s
Annealing	52 °C – 72 °C (siehe Fließtext)	20 s
Synthese	72 °C	30 s pro kb
Synthese	72 °C	10 min
Lagerung	16 °C	bis zur weiteren Verwendung

Die analytische PCR (*colony PCR*) diente zum Nachweis eines Plasmids in einer Bakterienkolonie, insbesondere bei der Klonierung oder nach Konjugationsversuchen. Hierfür wurde als Vorlagen-DNA keine gereinigte DNA verwendet, sondern Zellmaterial einer Kolonie. Die Scherkräfte beim Resuspendieren der Zellen und die hohe Temperatur im ersten Schritt der PCR reichen aus, um genügend Vorlagen-DNA freizusetzen.

Der Reaktionsansatz bestand bei der analytischen PCR aus 2,5 µl 2x MangoMix und je 1,25 µl 0,8 µM *forward* (fw) und *reverse* (rv) Primer (Endkonzentration der Primer: 0,2 µM, Gesamtvolumen: 5 µl). MangoMix enthält eine *Taq*-DNA-Polymerase, welche für die analytische PCR aufgrund ihrer größeren Robustheit gut geeignet ist. Eine geringe Menge Zellmaterial der zu testenden Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze

aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren im Reaktionsgefäß resuspendiert. Anschließend wurde das restliche, an der Spitze anheftende Zellmaterial auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum übertragen, um den Klon für weitere Versuche verwenden zu können. Das Temperaturprofil für die analytische PCR ist in Tabelle 21 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde statt Zellmaterial ein geeignetes gereinigtes Plasmid verwendet, die Negativkontrolle wurde ohne Vorlagen-DNA angesetzt. Nach Ablauf der Reaktion wurden die PCR-Produkte mittels analytischer Agarosegelelektrophorese untersucht.

Tabelle 21: Temperaturprofil bei der analytischen PCR (*colony PCR*).

SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT
Deckeltemperatur	105 °C	Während des gesamten Laufs
Zelllyse und initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 Zyklen, bestehend aus:		
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	T _m des Primerpaars (wenn unterschiedlich: niedrigere T _m)	30 s
Synthese	72 °C	30 s pro kb
Synthese	72 °C	10 min
Lagerung	16 °C	bis zur weiteren Verwendung

2.6.4 Präparative und analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde basierend auf der Arbeit von Sharp et al. (1973) durchgeführt. Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Beim pH-Wert des verwendeten TAE-Puffers (pH 8,0) liegt DNA negativ geladen vor, sodass die Fragmente sich nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode hin bewegen. Dabei werden größere Fragmente durch das Netzwerk des Gels stärker abgebremst als kleinere, sodass die Fragmente aufgetrennt werden.

Es wurden Agarosegele von 1,0 % bis 1,8 % (w/v) Agarose verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die eingewogene Agarose in 1x TAE-Puffer suspendiert und aufgeköcht, bis die Lösung klar und ohne sichtbare Schlieren war. Das Herstellungsgefäß wurde vor und nach dem Kochen gewogen und die verdampfte Menge an dH₂O wieder zugegeben, um die richtige Konzentration zu erhalten. Anschließend wurde das Agarosegel in die

Elektrophoresekammer gegossen und erstarren gelassen. Anschließend wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet, die Proben bei Bedarf mit 6x Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Referenz zur Größenbestimmung wurden 3 µl GeneRuler Mix verwendet. Die DNA-Fragmente wurden bei einer Spannung von 100 V für 40 min (analytische PCR) oder 90 min (präparative PCR) aufgetrennt. Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel für 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 mg/l) inkubiert und anschließend für 5 bis 15 min in einem dH₂O-Bad gewaschen. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und mittels dem Alpha Imager MINI dokumentiert. Bei der präparativen Agarosegelelektrophorese wurden die Banden mit den gewünschten DNA-Fragmenten mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und mittels Gelextraktion gereinigt. Für Fragmente bis 4 kb wurde das MinElute Gel Extraction Kit verwendet, größere Fragmente wurden mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt. Die Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte dabei jedoch wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben. Anschließend wurde die DNA-Konzentration bei 260 nm in der µCuvette G1.0 mit dem BioSpectrometer Fluorescence gemessen.

2.6.5 Linearisierung von pBACOV für die Klonierung

Um Zielsequenzen in ein Plasmid einzufügen bzw. vorhandene Elemente auszutauschen, muss das Plasmid zuerst linearisiert werden. Dafür wurde in dieser Arbeit der sequenzielle Restriktionsverdau angewendet. Hierbei wird das Plasmid zuerst mit dem einen Restriktionsenzym gespalten. Anschließend wird das erste Restriktionsenzym hitzeinaktiviert, gefolgt von der Inkubation mit dem zweiten Restriktionsenzym. Für die Klonierung der Glycosidhydrolasegene (*cel8A*, *cel9D*, *cel9R*, *xgh74A*) kamen dabei die Restriktionsenzyme *NdeI* und *XbaI* zum Einsatz, beim Erstellen von SP-Bibliotheken *EagI*-HF und *MluI*, und bei der Klonierung von Promotorsequenzen *SpeI* und *MluI*-HF.

Es wurden 4 µg pBACOV-DNA in einem Gesamtvolumen von 200 µl in CutSmart-Puffer (New England Biolabs) mit 80 U je Restriktionsenzym gespalten. Nach Inkubation mit dem ersten Restriktionsenzym für 2 h bei 37 °C wurde das Restriktionsenzym nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf Eis

abgekühlt, das zweite Restriktionsenzym hinzugefügt und wiederum 2 h bei 37 °C inkubiert. Das linearisierte Vektorrückgrat wurde anschließend mittels Gelextraktion gereinigt und die DNA-Konzentration bei 260 nm in der μ Cuvette G1.0 mit dem BioSpectrometer Fluorescence gemessen.

Zur Überprüfung des Restriktionsverdaus und der Reinigung wurde nun eine Testligierung durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 22 dargestellt. 5 μ l jedes Reaktionsansatzes wurden zur Transformation von *E. coli* TOP10 verwendet. Über die jeweilige Koloniezahl konnte die Menge an ungeschnittenem Plasmid (Ansatz ohne Ligase) bzw. einfach geschnittenem Plasmid (Ansatz mit Ligase) abgeschätzt werden.

Tabelle 22: Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen für die Testligierung zur Überprüfung des sequenziellen Restriktionsverdaus.

REAKTIONSANSATZ	
SUBSTANZ	VOLUMEN
Linearisierte Vektor-DNA	60 ng DNA, Volumen variabel
10x T4 Ligase Puffer	2 μ l
T4 DNA Ligase (400 U/ μ l]	1 μ l bzw. 0 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l
INKUBATIONSBEDINGUNGEN	
SCHRITT	INKUBATION
Ligierung	1 h bei Raumtemperatur
Hitzeinaktivierung	10 min bei 65 °C

2.6.6 Insertion von Zielgenen mittels Ligierung

Die Zielgene *cel8A*, *cel9D*, *cel9R* und *xgh74A* wurden als kodonoptimierte Versionen bei Eurofins Genomics GmbH synthetisiert (Kodonoptimierung: *cel8A*: *B. megaterium*; *cel9D*, *cel9R*, *xgh74A*: *B. subtilis*). Die Gene wurden aus dem Herstellerplasmid mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XbaI* ausgeschnitten und per Gelextraktion gereinigt. Die Insertion in pBACOV erfolgte mittels Ligierung, wobei ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 5:1 gewählt wurde. Zur Berechnung der benötigten Menge an Insert-DNA wurde das Webtool BioMath Calculator (Promega) verwendet. Die Reaktion wurde analog zu den Angaben in Tabelle 22 angesetzt und inkubiert, wobei neben dem

linearisierten Vektor nun auch Insert-DNA zugegeben wurde. Anschließend wurden 5 μ l des Ansatzes zur Transformation eines *E. coli* Klonierungsstammes eingesetzt.

2.6.7 Klonierung mittels Gibson Assembly

Die Klonierung des Vektorrückgrats pBACOV und des Plasmids pBACOV-*sfGFP* sowie die Insertion neuer Promotorsequenzen erfolgte mittels Gibson Assembly. Diese Methode ermöglicht es, mehrere DNA-Fragmente (PCR-Produkte oder linearisiertes Plasmid-Rückgrat) in einem Schritt zusammenzufügen (Gibson et al., 2009). In einer isothermalen Reaktion laufen drei aufeinander aufbauende, enzymkatalysierte Schritte bei 50 °C parallel ab:

- Eine 5'-Exonuklease legt einen DNA-Einzelstrang am 3'-Ende der Zielsequenz frei, sodass sich Fragmente mit passenden Sequenzabschnitten aneinander anlagern können.
- Nach dem Anlagern zweier aufeinanderfolgender DNA-Fragmente werden die Lücken durch Phusion DNA-Polymerase aufgefüllt.
- Eine *Taq* DNA-Ligase versiegelt die Einzelstrangbrüche zwischen den zwei Fragmenten.

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Schritte des Gibson Assembly. Damit die Reaktion effizient ablaufen kann, müssen die zu verbindenden Sequenzen an den Enden mit ca. 20 bp überlappen (blaue bzw. rote Sequenzabschnitte in Abbildung 4). Dabei muss die Annealingtemperatur mindestens 48 °C betragen, wobei angenommen wird, dass ein A-T-Paar 2 °C zur Annealingtemperatur beiträgt und ein G-C-Paar 4 °C. Die überlappenden Enden werden beim Design der Primer als 5'-Verlängerungen mit geplant und synthetisiert. Beim Primerdesign wurden die Empfehlungen des Herstellers des Reaktions-Mastermix (New England Biolabs) befolgt. Die Reaktion wurde wie vom Hersteller empfohlen angesetzt, jedoch wurde der Reaktionsmaßstab auf 10 μ l reduziert und die Reaktionszeit auf 1 h erhöht. Nach Ablauf der Reaktion wurden 5 μ l zur Transformation von *E. coli* DH10 β oder *E. coli* Stellar verwendet.

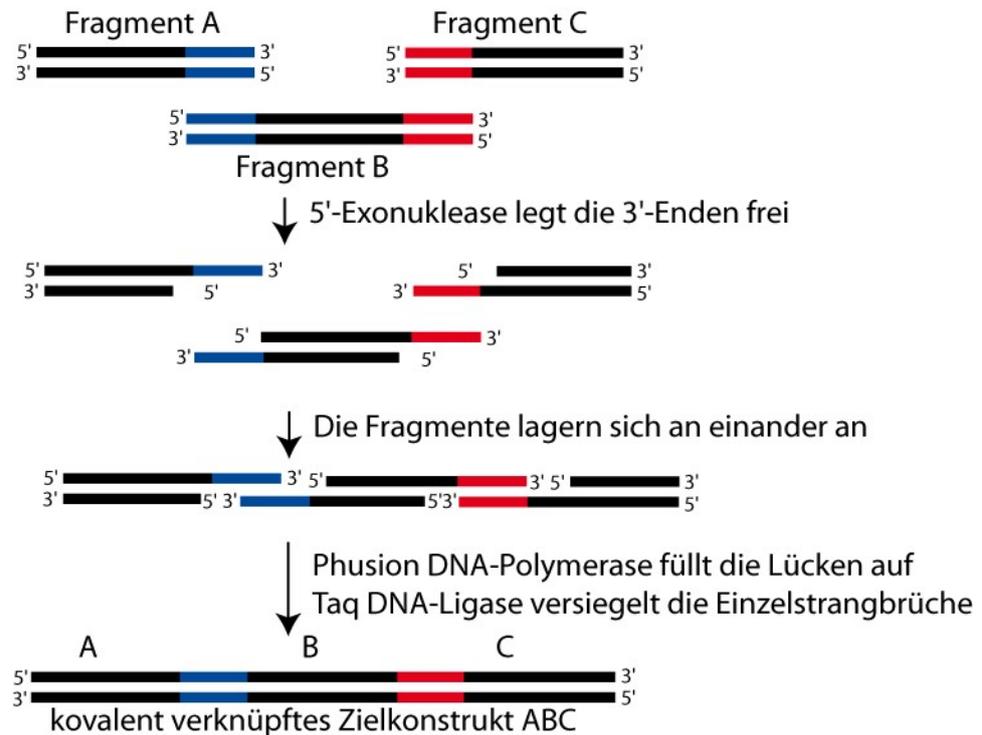


Abbildung 4: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Verbindung dreier DNA-Fragmente mittels Gibson Assembly. Die blauen bzw. roten Enden symbolisieren übereinstimmende Sequenzabschnitte, die zum Anlagern der Fragmente nötig sind.

2.6.8 Erstellen von SP-Bibliotheken mittels In-Fusion Assembly

Zur Herstellung von SP-Bibliotheken wurde das *B. subtilis* Secretory Protein Expression System (TaKaRa Bio) eingesetzt. Dieses Kit enthält eine SP-DNA-Mischung mit den kodierenden Sequenzen für 173 SP aus *B. subtilis*. Diese werden anstelle des ursprünglich vorhandenen SP_{aprE} in das Expressionsplasmid eingefügt. Dabei besitzen die Sequenzen der SP-DNA-Mischung zum Vektor passende 15-bp-Überhänge, die für das In-Fusion-Assembly optimiert sind. Das In-Fusion-Assembly beruht auf dem gleichen Prinzip wie das Gibson-Assembly. Im Gegensatz zum Gibson-Assembly enthält das Enzymgemisch bei der In-Fusion-Reaktion jedoch eine 3'-Exonucleaseaktivität und keine Ligase, sodass die Einzelstrangbrüche nicht versiegelt werden. Dieser Schritt erfolgt erst nach der Aufnahme des Produkts in *E. coli*.

Zuerst wurde SP_{aprE} mittels Restriktionsverdau (*EagI*-HF und *MluI*, siehe Kapitel 2.6.5) aus dem Expressionsplasmid entfernt. Um die Vollständigkeit des Restriktionsverdaus zu

bestätigen, wurden eine Testligierung (Ligierung von Plasmid ohne Insert) und Testtransformation durchgeführt. Anschließend wurde mittels In-Fusion Assembly unter Verwendung des In-Fusion HD Cloning Systems (TaKaRa Bio) die SP-DNA-Mischung nach Herstellerangaben in das Plasmid eingefügt. Der Reaktionsansatz (10 µl) enthielt 100 ng linearisierte Plasmid-DNA und SP-DNA-Mischung in einem molaren Verhältnis von Insert zu Vektor von 2:1 sowie 2 µl der InFusion-Enzymmischung. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 50 °C. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor mit der Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Stellar™ begonnen wurde.

Bei der Erstellung von SP-Bibliotheken wurde für die Transformation von *E. coli* Stellar™ mit dem In-Fusion-Reaktionsprodukt folgendes, von Kapitel 2.6.2 abweichende Transformationsprotokoll verwendet: Kompetente *E. coli* Stellar™ wurden auf Eis aufgetaut und zu 100 µl aliquotiert. 8 µl des In-Fusion-Reaktionsansatzes wurden zu den Zellen hinzugegeben und vorsichtig in einem sterilen, vorgekühlten Reagenzglas gemischt. Nach Inkubation bei 30 °C auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 s im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen für 1 min auf Eis abgekühlt und dann mit 900 µl 37 °C-warmem SOC-Medium vermischt. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und jeweils 200 µl auf fünf LB_{carb}-Agarplatten ausplattiert. Auf diese Weise wurde eine größtmögliche Anzahl an Einzelkolonien erzielt.

2.6.9 Klonierung von CRISPR/Cas9-Plasmiden mittels Golden Gate Assembly

Zur gezielten Gendeletion wurde das pCasPP-System eingesetzt (Rüterling et al., 2017). Das pCasPP-Plasmid (Leervektor) sowie zwei fertige pCasPP-Plasmide zur Deletion von Genen für die EPS-Produktion in *P. polymyxa* DSM365 wurden von Christoph Schilling (Lehrstuhl für Chemie biogener Rohstoffe, Prof. Sieber, TUM) zur Verfügung gestellt. Die *spacer*-Sequenzen der sgRNAs, welche für die Erkennung der Zielsequenzen erforderlich sind, wurden mittels der Software CasOT (Xiao et al., 2014) ausgewählt. Anschließend wurden anhand dieser Sequenzen gemäß Cobb et al. (2015) 24 bp Oligonucleotidpaare für die *guide*-Region der sgRNAs entwickelt. Die Oligonucleotidpaare sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Oligonucleotide wurden mittels T4

Polynucleotidkinase phosphoryliert und direkt im Anschluss annealt, um doppelsträngige Fragmente mit 5'-Überhängen, die *guide*-DNA, zu bilden (Tabelle 23).

Tabelle 23: Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen für die Erzeugung annealter *guide*-Region-Inserts aus Oligonucleotiden für CRISPR/Cas9-Plasmide.

REAKTIONANSATZ	
SUBSTANZ	VOLUMEN
Oligonucleotid fw, 100 µM	1 µl
Oligonucleotid rv, 100 µM	1 µl
T4 Polynucleotidkinase	1 µl
T4 Ligase Puffer	1 µl
ddH ₂ O	6 µl
INKUBATIONSBEDINGUNGEN	
SCHRITT	INKUBATION
Phosphorylierung	30 min bei 37 °C
Inaktivierung der Polynucleotidkinase und Vorbereitung zum Annealing	5 min bei 95 °C
Annealing	Abkühlung auf 25 °C durch Absenkung der Temperatur um 0,5 °C pro 6 s

Das Produkt dieser Reaktion wurde 1:100 verdünnt und mittels Golden Gate Assembly (Engler et al., 2008) in pCasPP eingefügt (Tabelle 24). Beim Golden Gate Assembly laufen der Restriktionsverdau und die Ligierung mittels T7 DNA Ligase in einem Ansatz ab. Dies wird durch die Verwendung eines Typ IIS Restriktionsenzym (hier: *Bbs*I) ermöglicht, welches die DNA außerhalb der Erkennungssequenz spaltet. Die Spaltstellen des Restriktionsenzym liegen vor und hinter der Erkennungssequenz, sodass die Erkennungssequenzen durch den Restriktionsverdau entfernt werden. Anschließend können das Insert (hier: die *guide*-DNA) und der geschnittene Vektor über passende, überhängende Enden ligiert werden.

Tabelle 24: Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen für die Insertion der *guide*-DNA in pCasPP mittels Golden Gate Assembly.

REAKTIONSANSATZ	
SUBSTANZ	VOLUMEN
<i>Bbs</i> I (10 U/ μ l)	0,75 μ l
T7 DNA-Ligase	0,25 μ l
10x CutSmart Puffer	1 μ l
ATP (10 mM)	1 μ l
DTT (10 mM)	1 μ l
pCasPP Plasmid-DNA	100 ng
Annealte <i>guide</i> -DNA, 1:100 verdünnt	1 μ l
ddH ₂ O	ad 10 μ l
INKUBATIONSBEDINGUNGEN	
SCHRITT	INKUBATION
20 Zyklen:	
Restriktionsverdau	5 min bei 37 °C
Ligierung	5 min bei 20 °C
Hitzeinaktivierung	20 min bei 80 °C
Abkühlen	12 °C

Eventuell vorhandene, restliche lineare DNA wurde mittels der PlasmidSafe ATP-dependent DNase abgebaut (Tabelle 25). Anschließend wurden 15 μ l des Reaktionsansatzes für die Transformation von *E. coli* DH10 β verwendet.

Tabelle 25: Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen für den Abbau linearer DNA aus den Golden Gate Assembly Reaktionsansätzen vor der Transformation

REAKTIONSANSATZ	
SUBSTANZ	VOLUMEN
PlasmidSafe ATP-dependent DNase	1,5 μ l
10x PlasmidSafe Puffer	1,5 μ l
10 mM ATP	1,5 μ l
Reaktionsprodukt des Golden Gate Assembly	10 μ l
ddH ₂ O	0,5 μ l
INKUBATIONSBEDINGUNGEN	
SCHRITT	INKUBATION
Abbau linearer DNA	30 min bei 37 °C
Hitzeinaktivierung	30 min bei 70 °C
Abkühlen	16 °C

Nach der korrekten Insertion der *guide*-DNA wurde das Plasmid als pCasPP-„Zielgen“sg bezeichnet. Nun wurden die homologen Flanken in pCasPP-sg eingefügt. Die Flanken für die Zielgene *spoIV*, *spo0A*, *sigF2*, *npr2* und *npr1+2* wurden aus den Plasmiden pDel2, pDel3, pDel4, pDel7 und pDel8 (Tabelle 14) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels *XbaI* geschnitten und in das *SpeI*-linearisierte pCasPP-„Zielgen“sg eingefügt. Zur Reduktion von Vektorreliganden wurde das linearisierte pCasPP-„Zielgen“sg zudem mit Antartic Phosphatase nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Wegen einer internen *XbaI*-Schnittstelle wurden die Flanken für *spoIV* mit *SpeI* geschnitten. Die Insertion erfolgte mittels Ligierung anhand der kompatiblen Überhänge.

2.6.10 Quikchange-Mutagenese

Die QuikChange Mutagenese ermöglicht es, gezielte Punktmutationen in ein DNA-Konstrukt einzuführen. Dazu wird ein komplementäres Paar Mutageneseprimer verwendet. In dieser Arbeit wurde das zweistufige Protokoll nach Wang & Malcolm (1999) angewendet.

Im ersten Schritt wurde das zu mutierende Plasmid in zwei separaten Ansätzen vervielfältigt, wobei jeder Ansatz nur einen der beiden Primer enthielt, um Primerdimerisierung zu vermeiden. Im zweiten Schritt wurden die beiden Ansätze vereinigt und eine zweite PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die Inkubationsbedingungen der einzelnen Schritte sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Reaktionsansatz und Inkubationsbedingungen bei der zweistufigen QuikChange Mutagenese nach Wang & Malcolm (1999).

REAKTIONSANSATZ – QUIKCHANGE REAKTION 1		
SUBSTANZ	VOLUMEN	ENDKONZENTRATION
Primer fw oder rv [10 µM]	1 µl	0,2 µM
dNTPs [jeweils 10 mM]	1 µl	200 µM
5x Phusion GC Puffer	10 µl	1x
Phusion HF DNA polymerase [2 U/µl]	0,5 µl	1 U pro 50 µl Ansatz
Vorlagen-DNA	1 µl	50-200 ng pro 50 µl Ansatz
ddH ₂ O	36,5 µl	-

TEMPERATURPROFIL – QUIKCHANGE REAKTION 1		
SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT
Deckeltemperatur	110 °C	Während des gesamten Laufs
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
10 Zyklen, bestehend aus:		
Denaturierung	98 °C	30 s
Annealing	55 °C	1 min
Synthese	72 °C	8 min
Synthese	72 °C	10 min
Lagerung	16 °C	bis zur weiteren Verwendung

REAKTIONSANSATZ – QUIKCHANGE REAKTION 2	
SUBSTANZ	VOLUMEN
Reaktionsansatz aus Reaktion 1 mit fw Primer	25 µl
Reaktionsansatz aus Reaktion 1 mit rv Primer	25 µl
Phusion HF DNA polymerase [2 U/µl]	0,5 µl

TEMPERATURPROFIL – QUIKCHANGE REAKTION 2		
SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT
Deckeltemperatur	110 °C	Während des gesamten Laufs
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
30 Zyklen, bestehend aus:		
Denaturierung	98 °C	15 s
Annealing	55 °C	15 s
Synthese	72 °C	4,5 min
Synthese	72 °C	10 min
Lagerung	16 °C	bis zur weiteren Verwendung

Im Anschluss wurde die mutationsfreie Vorlagen-DNA mittels *DpnI* abgebaut. Dieses Restriktionsenzym baut DNA nur dann ab, wenn die Adenin-Basen in der Erkennungssequenz (5' GATC 3') auf beiden Strängen methyliert sind. Somit erkennt *DpnI* nur die aus *E. coli* isolierte und daher methylierte Vorlagen-DNA. Im Gegensatz dazu weisen die mutierten PCR-Produkte keine Methylierung auf und werden nicht abgebaut. Dazu wurde der Reaktionsansatz der QuikChange Mutagenese mit 10 U *DpnI* versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde *DpnI* für 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert und 5 µl des Reaktionsansatzes zur Transformation von *E. coli* DH10β verwendet.

2.6.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Elution erfolgte jedoch mit ddH₂O statt Elutionspuffer. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das ddH₂O auf 60 °C vorgewärmt und das Säulchen nach Zugabe des ddH₂O für 5 min bei 60 °C inkubiert.

Um Plasmid-DNA aus Gram-positiven Bakterien zu isolieren, kam das NucleoSpin Plasmid DNA purification Kit (Macherey-Nagel) zum Einsatz. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Zellyse mit 10 mg/ml Lysozym für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA wurde wie bei der Plasmid-Isolierung aus *E. coli* durchgeführt. Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurden photometrisch bestimmt und die isolierte DNA bei -20 °C gelagert.

2.6.12 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

Zur Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde die Firma Eurofins Genomics beauftragt (Übernacht-Sequenzierung mittels Sanger-Sequenzierung). Dazu wurden 15 µl der zu sequenzierenden DNA (Konzentration: 50 – 100 ng/µl) mit 2 µl des gewünschten Sequenzierprimers (1 µM) gemischt und an Eurofins gesendet.

2.6.13 Isolierung genomischer DNA

Um genomische DNA (gDNA) zur Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA Gens zu isolieren, wurde das innuPREP Bacteria DNA Kit (Analytik Jena) nach Herstellerangaben verwendet.

Als Vorlagen-DNA für präparative PCRs und für die Genomsequenzierung wurde hochreine, hochmolekulare gDNA verwendet. Diese wurde von Caroline Ziegler (ZIEL - Institute for Food & Health, Core Facility Mikrobiom / NGS) nach einer modifizierten CTAB-Methode (Cetyl-Trimethylammoniumbromid, Böhm et al., 2015) isoliert und zur Verfügung gestellt.

2.6.14 Sequenzierung von genomischer DNA

Das Genom von *P. polymyxa* DSM 292 wurde an der Zentraleinrichtung für *Next Generation Sequencing* des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL, TUM) mittels Illumina-Sequenzierung sequenziert.

Aus der chromosomalen DNA wurde mittels des TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, USA) eine DNA-Bibliothek hergestellt. Dabei wurde ein Protokoll für optimierte DNA-Fragmentierung und Größenauswahl verwendet (Huptas et al., 2016). Die so generierte DNA-Bibliothek wurde auf einer Illumina MiSeq Anlage nach Herstellerangaben sequenziert. Die Sequenzdaten wurden mittels SPAdes v3.6.1 mit aktivierter BayesHammer Fehlerkorrektur und MismatchCorrector assembliert (Bankevich et al., 2012). Die Assemblies wurden mittels Quast v3.1 ausgewertet (Gurevich et al., 2013). Offene Leserahmen (ORFs) wurden mittels Prokka v1.11 vorhergesagt und annotiert (Seemann, 2014).

2.6.15 Plasmidtransfer in Gram-positive Akzeptorstämme mittels triparentaler Konjugation

Die triparentale Konjugation („*transmating*“) wurde wie in Heinze et al. (2018a) beschrieben durchgeführt. Die hier beschriebene Methode eignet sich auch, um mehrere Akzeptorstämme parallel zu transkonjugieren, da für alle Akzeptoren die gleichen Donor- und Helferstämmen verwendet werden können. Abbildung 5 stellt den experimentellen Ablauf schematisch dar.

Zunächst wurden Vorkulturen des Gram-positiven Akzeptorstammes, des Donors und des Helferstammes *E. coli* HB101 pRK2013 in 20 ml LB Medium angesetzt. Als Donoren dienten *E. coli* Klonierungsstämmen (TOP10, DH10 β oder StellarTM), welche das jeweilige Zielplasmid trugen. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ aller Kulturen ermittelt. Anschließend wurden die Vorkulturen verwendet, um 20 ml Hauptkulturen auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,2 anzuimpfen. Der Rest der Vorkulturen wurde auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Hauptkulturen wurden wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben inkubiert, wobei die OD₆₀₀ regelmäßig überprüft wurde. Die erste OD₆₀₀-Messung

erfolgte nach ca. 90 – 100 min, weitere Messungen erfolgten je nach Wachstumsgeschwindigkeit in Abständen von 15 – 45 min. Sobald die OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,9 lag (Ziel: 0,7), wurden von allen Kulturen jeweils 2 ml entnommen und auf Eis gelagert. Die Hauptkulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von mindestens 1,2 weiterinkubiert und dann auf Eis gelagert. Entsprechend standen nun von jedem Stamm 2 ml Aliquots aus drei Wachstumsphasen zur Verfügung: „ÜN“ (stationäre Phase), „OD 0,7“ (mittlere exponentielle Phase) und „OD 1,2“ (späte exponentielle Phase). Im nächsten Schritt wurden die Kulturen von Donor, Akzeptor und Helfer der gleichen Wachstumsphase wie im Folgenden beschrieben gemischt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 1 900 g und 4 °C für 5 min durchgeführt. Zuerst wurden 2 ml Donor-Kultur abzentrifugiert und in 2 ml Akzeptorkultur resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das gemeinsame Zellpellet in 2 ml Helferkultur resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Das so erzeugte Zellpellet wurde zweimal gewaschen, indem es in 1 ml frischem LB-Medium resuspendiert und abzentrifugiert wurde, um Antibiotikaspuren aus den Donor- und Helferkulturen zu entfernen. Das Zellpellet wurde im Rücklauf resuspendiert. Sterile Kreuzungfilter (Celluloseacetat, Porengröße: 0,2 µm, Durchmesser: 25 mm, Sartorius Stedim) wurden mit einer abgeflammt Pinzette haftend auf LB-Agarplatten (Konjugationsplatten) aufgelegt. Die Konjugationsansätze wurden vorsichtig auf die Kreuzungfilter pipettiert, sodass das Gemisch möglichst vollständig auf dem Kreuzungfilter blieb. Die Konjugationsplatten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kreuzungfilter mit den darauf gewachsenen Bakterienrasen in 5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml LB-Medium durch Vortexen von den Filtern geerntet. Diese Zellsuspensionen wurden zu 200 µl auf jeweils 5 Selektions-Agarplatten (LB mit Pol und Kan) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht oder bei 30 °C für bis zu drei Tage inkubiert, bis Kolonien erkennbar waren. Die Konzentration der Antibiotika im Selektionsagar war abhängig vom jeweiligen Akzeptorstamm (siehe Kapitel 3.1.3). Korrekte Transkonjuganten wurden mittels analytischer PCR unter Verwendung plasmidspezifischer Primer sowie durch Sequenzierung des 16S rRNA Gens (Primer 616V und 630R, Loy et al., 2005) identifiziert.

a) Plasmidtransfer mittels triparentaler Konjugation

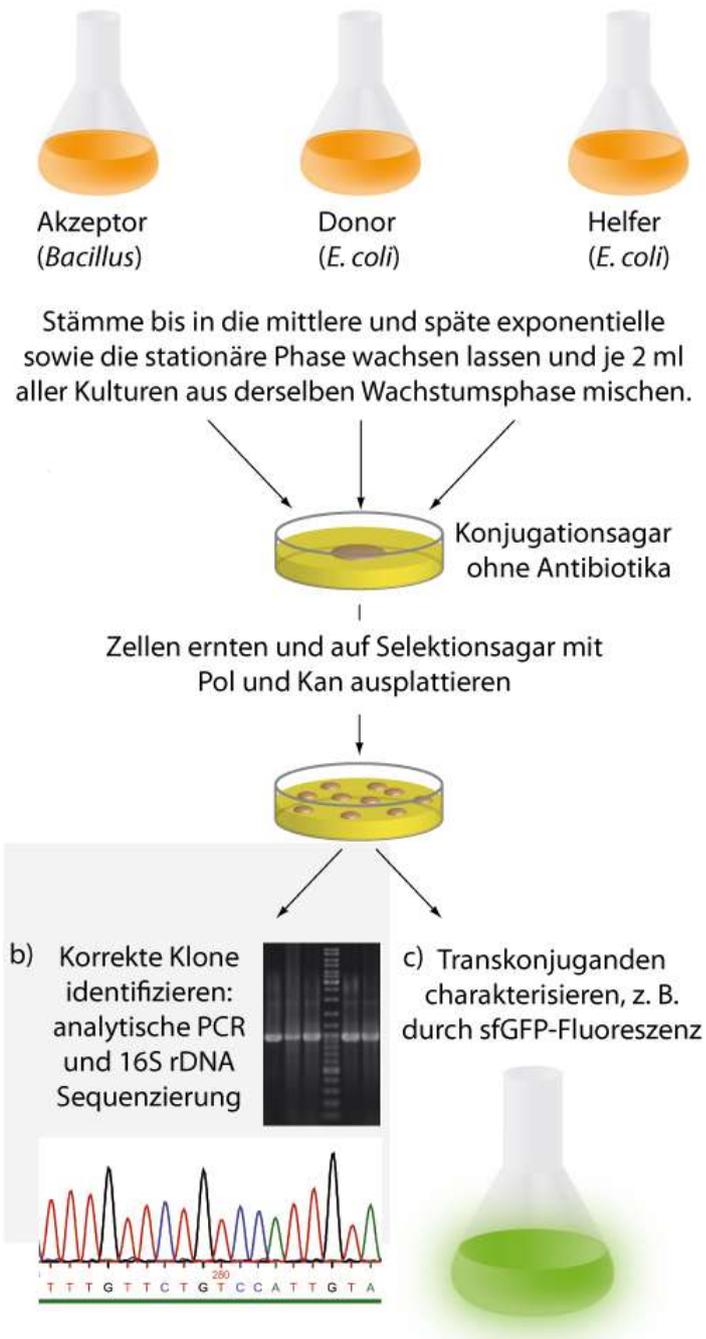


Abbildung 5: Schritte für die Plasmidübertragung von *E. coli* zu Gram-positiven Akzeptorstämmen mittels triparentaler Konjugation. **a)** Es werden ein Akzeptorstamm (z. B. *Bacillus*), ein Donorstamm (*E. coli* Klonierungsstamm mit dem Zielplasmid) und der Helferstamm *E. coli* HB101 pRK2013 eingesetzt. Nach der Konjugation auf Agarplatten ohne Antibiotika werden die Zellen auf eine Selektionsplatte mit geeigneten Konzentrationen an Pol und Kan übertragen. **b)** Das Zielplasmid wird mittels analytischer PCR nachgewiesen, die Art des Empfängerstamms durch Sequenzierung des 16S rRNA Gens bestätigt. **c)** Phänotypische Charakterisierung der Transkonjuganten, z.B. anhand der sfGFP-Fluoreszenz oder extrazellulärer Enzymaktivität.

2.6.16 Erzeugung gezielter Gendelektionen mittels CRISPR/Cas9

Die erzeugten CRISPR/Cas9-Plasmide wurden mittels triparentaler Konjugation in die gewünschten *P. polymyxa*-Stämme übertragen. Gewachsene Kolonien wurden mittels analytischer PCR auf die erwartete Mutation hin untersucht.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode

Die Gesamtproteinkonzentration von Kulturüberständen wurde kolorimetrisch nach Bradford (1976) gemessen.

Dazu wurden 1 ml Coomassie Plus Protein Assay Reagenz (Thermo Fisher Scientific) mit 50 µl Probe vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm (E_{595}) gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer BSA-Referenzkurve von 0 – 500 µg/ml.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Extinktion

Die Proteinkonzentration gereinigter Proteinlösungen (z. B. Cel8A) wurde mittels UV-Extinktion bei 280 nm unter denaturierenden Bedingungen gemessen (Cantor & Schimmel, 1980). Dazu wurden in drei Ansätzen 150 µl 8M Harnstofflösung mit 10 µl, 15 µl und 20 µl Probelösung gemischt und in UVetten (Schichtdicke 10 mm) die E_{280} gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$E_{280} = \varepsilon \times c \times d$$

$$c = \frac{E_{280}}{\varepsilon \times d}$$

wobei c : Konzentration der Messlösung in der Küvette [$\text{mol} \times \text{l}$]

ε : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d : Schichtdicke [cm]

Der molare Extinktionskoeffizient wurde mit ExPASy ProtParam (Gasteiger et al., 2005) berechnet, wobei der Wert unter reduzierenden Bedingungen („*assuming all Cys-Residues are reduced*“) verwendet wurde.

Um die errechnete Konzentration von mol/l in mg/ml umzurechnen, wurde die Formel um den Term für das Molekulargewicht M (berechnet mit CloneManager) erweitert. Zudem wurden die verwendeten Volumina V von 8 M Harnstoff und Probelösung

berücksichtigt, um die Konzentration der ursprünglichen Probelösung zu erhalten:

$$c = \frac{E_{280}}{\varepsilon \times d} \times M \times \frac{V_{gesamt}}{V_{Probe}}$$

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die analytische Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht mittels Elektrophorese und beruht auf dem vom Laemmli (1970) beschriebenen Prinzip. Durch das anionische Detergens SDS werden die Polypeptide entfaltet und negativ geladen, sodass sie sich im elektrischen Feld zur Anode hin bewegen. Disulfidbrücken werden durch das β -Mercaptoethanol im Auftragspuffer reduziert. Entsprechend liegen die Polypeptidketten annähernd linear vor, sodass größere Moleküle proportional stärker durch das Polymernetzwerk des Polyacrylamidgels abgebremst werden und langsamer durch das Gel wandern. Für die SDS-PAGE wurden entweder selbst hergestellte, 10%ige Gele (siehe Tabelle 27) oder fertige MiniPROTEAN TGX Gele (Bio-Rad) in unterschiedlichen Ausführungen verwendet.

Tabelle 27: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE und die native PAGE. Die Bestandteile wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Durch TEMED und APS wird die radikalische Polymerisation des Gels gestartet. Die Zusammensetzung von nativem und SDS-haltigem Trenngel- und Sammelgel-Puffer ist in Tabelle 10 angegeben.

SUBSTANZ	TRENNGEL (10 %)	SAMMELGEL
ddH ₂ O	2,08 ml	1,55 ml
Trenngel-Puffer (SDS oder nativ)	1,25 ml	-
Sammelgel-Puffer (SDS oder nativ)	-	0,625 ml
Acrylamid-4K Lösung (30%)	1,66 ml	0,33 ml
TEMED	5 μ l	3 μ l
10 % (w/v) APS	35 μ l	25 μ l

Für die SDS-PAGE wurde die Probenvorbereitung wie folgt durchgeführt:

- Proteinlösungen und Kulturüberstände: 15 μ l Probe wurden mit 5 μ l 4x SDS-Auftragspuffer vermischt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. 15 μ l wurden pro Gelspur aufgetragen.

- Proteinpellets nach TCA-Fällung: Die Pellets wurden in 30 µl 1x SDS-Auftragspuffer aufgenommen. War diese Lösung zu sauer (erkennbar an der gelben Farbe), wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH erhöht, bis die Lösung wieder die blaue Farbe des Auftragspuffers aufwies. Die Probe wurde für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. 15 µl der Lösung wurden pro Spur des Gels aufgetragen.
- Referenzproteine (Cel8A, Cel9D, Cel9R, Xgh74A): 5 µg gereinigtes Referenzprotein wurden auf 15 µl in 1x SDS-Auftragspuffer verdünnt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht.
- Nach dem Aufkochen wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und kurz abzentrifugiert.
- Die Proben sowie geeignete Referenzen (PageRuler Prestained) wurden auf das Gel aufgetragen.
- Ein Stromfluss von 15 mA pro Gel wurde für ca. 110 min angelegt, bis die Bromphenolblau-Front des Auftragspuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.
- Das Gel wurde zum Anfärben 30 min in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel für zwei mal 15 min in Entfärber geschwenkt, sodass nur die spezifisch angefärbten Proteinbanden sichtbar wurden und der Rest des Gels entfärbt wurde. Zur Erhöhung des Kontrasts wurde das Gel anschließend noch über Nacht in Wasser geschwenkt.

Um die Komplexbildung cellulosomaler Enzyme mit CipA zu untersuchen, wurde die native PAGE verwendet. Hierbei bleiben die Proteine in ihrer nativen Struktur, sodass etwaige gebildete Komplexe erhalten bleiben. Hierbei haben die Tertiär- bzw. Quartärstruktur einen wesentlichen Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität der Proteine im Gel, sodass keine Auftrennung nach Größe erfolgt. Die Komplexbildung wird jedoch durch das Verschieben einzelner Banden im Vergleich zu entsprechenden unkomplexierten Referenzen sichtbar.

Die Vorgehensweise bei der nativen PAGE entsprach prinzipiell der der SDS-PAGE. Im Unterschied zur SDS-PAGE wurden jedoch SDS-freie Trenngel-, Sammelgel- und

Laufpuffer sowie der native Auftragspuffer verwendet (Pufferzusammensetzung siehe Tabelle 10). Zudem wurden die Proben nach dem Vermischen mit dem Auftragspuffer nicht aufgeköcht, sondern direkt auf das Gel aufgetragen.

2.7.4 Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot

Der Western-Blot ermöglicht es, elektrophoretisch getrennte Proteine mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen (Renart et al., 1979).

Dazu wurden die Proteine zunächst mittels nativer oder SDS-PAGE aufgetrennt. Anstatt die Gele zu färben, wurden die Proteine elektrophoretisch vom Gel auf eine Polylvinylidendifluorid-Membran übertragen (PVDF). Dazu wurde auf der angefeuchteten Kohlenstoffanode des halbtrockenen Blotting-Apparats zunächst ein Stapel aus fünf Whatman-Papierstücken (Typ 1) in der Größe des Gels aufgelegt. Die Whatman-Papierstücke wurden zuvor in Transferpuffer (siehe Tabelle 10) getaucht. Nun wurde die mit Methanol benetzte PVDF-Membran auf den Stapel gelegt, gefolgt vom PA-Gel. Als letzte Schicht wurden wiederum fünf in Transferpuffer getränkte Whatman-Papierstücke hinzugefügt. Um einen vollständigen Transfer der Proteine sicherzustellen, wurden eventuell vorhandene Luftblasen aus dem Stapel herausgedrückt. Nun wurde die angefeuchtete Kohlenstoffkathode der Blotting-Apparatur aufgelegt und ein elektrischer Strom von 70 mA pro Blot für 1,5 h angelegt. Anschließend wurde die Membran für 30 min in PBS-T (siehe Tabelle 10) gewaschen. Nun wurde die Membran in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml PBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver sowie dem (primären) Antikörper (siehe Tabelle 8) überführt. Das Magermilchpulver dient zum Abblocken unspezifischer Proteinbindestellen auf der Membran. Die Inkubation erfolgte bevorzugt rollend im Hybridisierofen bei 37 °C für 60 min oder schwenkend bei 4 °C über Nacht. Sofern die Verwendung eines sekundären Antikörpers erforderlich war, wurde die Membran dreimal für 15 min in PBS-T gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit dem Sekundärantikörper in PBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (37 °C, 30 min). Wenn der Primärantikörper bereits mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, war dieser Schritt nicht erforderlich. Anschließend wurde die Membran wiederum dreimal für 15 min gewaschen (PBS, ohne Tween).

Zur Detektion der immunologisch nachweisbaren Proteinbanden wurde die Membran nun mit 5 ml Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega) beträufelt und bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert, bis die Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde nun durch Zugabe von dH₂O abgestoppt.

2.7.5 Expression von *sfGFP* und Bestimmung der relativen *sfGFP*-Fluoreszenz

Für Versuche zur *sfGFP*-Expression wurde das auf Spizizens Minimalmedium (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961; Spizizen, 1958) basierende SM-Cas Medium verwendet (siehe Tabelle 9), welches kein Tryptophan enthält, dafür jedoch 1 g/l Casamino Acids. Für *P. polymyxa* DSM356 wurden noch 150 µg/l Biotin hinzugefügt, für den tryptophanauxotrophen Stamm *B. subtilis* RIK1285 50 mg/l Tryptophan.

20 ml SM-Cas (mit geeigneten Konzentrationen Kan) wurden mit einer Einzelkolonie des zu untersuchenden *Bacillus*-Stammes mit pBACOV-*sfGFP* oder dem jeweiligen Wildtyp-Stamm (als Negativkontrolle) angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C und 180 rpm (*B. mycoides*: 30 °C, 72 h). Anschließend wurde die OD₆₀₀ der Kulturen gemessen. Um die relative Fluoreszenz normalisiert auf die Zelldichte zu ermitteln, wurden die Kulturen mit SM-Cas auf OD₆₀₀ = 1 verdünnt. Nun wurden die OD₆₀₀ und die Fluoreszenzintensität (Anregung: 470 nm, Emission: 520 nm) in UVetten bei einer Schichtdicke von 2 mm gemessen (Photometer: BioSpectrometer Fluorescence, Eppendorf). Um die relative Fluoreszenz zu berechnen, wurde die gemessene Fluoreszenzintensität durch die gemessene OD₆₀₀ dividiert. Alle Messungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

2.7.6 Bestimmung der β -Glycosidaseaktivität in Kulturüberständen und gereinigten Enzympräparaten mittels DNSA

Die Bestimmung der β -Glycosidaseaktivität mittels DNSA nach Miller (1959) beruht auf dem Nachweis reduzierender Enden, die bei der enzymatischen Hydrolyse von Polysacchariden frei werden (Wood & Bhat, 1988). Die Aldehydgruppen reduzierender Zucker reduzieren 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA) zu 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure, wodurch sich der Farbton der Lösung von gelb zu orange-rot bis rotbräunlich ändert. Die gebildete 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure wird photometrisch durch Messung der E_{540} nachgewiesen. Die E_{540} ist proportional zur Anzahl freigesetzter reduzierender Enden während des enzymatischen Abbaus der Polysaccharide. Der DNSA-Test wurde zur Charakterisierung gereinigter Enzympräparate und zur Aktivitätsmessung von Kulturüberständen verwendet. Bei der Aktivitätsmessung von Kulturüberständen ist zu beachten, dass das Medium selbst keine reduzierenden Zucker (wie z.B. Glucose) enthalten darf, da diese die Messung stören würden.

Der DNSA-Test wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden pro Kavität 75 μ l einer 1 %-igen (w/v) Substratlösung (BBG, CMC oder XG) und 37,5 μ l Puffer (Natriumacetat-Puffer, pH 5,0 oder MOPS-Puffer pH 6,5, siehe Tabelle 10) vorgelegt. Anschließend wurden 37,5 μ l Probe (Kulturüberstand oder verdünnte Enzymlösung) hinzugegeben und die Platte mit einer Folie im Hitzeversiegler verschlossen. Die Inkubation erfolgte entweder im Wasserbad oder im PCR-Cycler, wobei die Inkubationsbedingungen abhängig vom jeweiligen Enzym waren. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Platten in Eis abgekühlt. In einer frischen Mikrotiterplatte wurden je Kavität 75 μ l DNSA-Reagenz (siehe Tabelle 10) vorgelegt und mit 50 μ l der Reaktionsansätze vermischt. Für die Auswertung wurde auf jeder Platte zudem eine Referenzkurve mit Glucosestandards der Konzentrationen 0 g/l, 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,4 g/l, 0,8 g/l, 1,0 g/l, 1,5 g/l und 2,0 g/l in MilliQ-H₂O mitgeführt (Dreifachbestimmung). Die Platte wurde hitzeversiegelt und für 5 min bei 95 °C im PCR-Cycler inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Platte wurde nun für 2 min bei 3 500 rpm abzentrifugiert um gegebenenfalls entstandene Niederschläge zu entfernen. Es wurden

aus jeder Kavität 100 µl in eine F-Profil Mikrottestplatte überführt und die E₅₄₀ im Plattenphotometer gemessen.

Die Auswertung erfolgte anhand einer sigmoidalen Regressionskurve der acht Glucosestandards. Dabei wurde die enzymatische Einheit U als die Enzymmenge definiert, die 1 µmol Glucoseäquivalent pro Minute freisetzt:

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{n_{\text{Glucoseäquivalent}} [\mu\text{mol}]}{t_{\text{Inkubation}} [\text{min}]}$$

$$\begin{aligned} \text{Spezifische Aktivität gereinigter Enzyme} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] \\ = \frac{n_{\text{Glucoseäquivalent}} [\mu\text{mol}]}{t_{\text{Inkubation}} [\text{min}] \times m_{\text{Enzym}} [\text{mg}]} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Spezifische Aktivität von Kulturüberständen} \left[\frac{\text{U}}{\text{l}} \right] \\ = \frac{n_{\text{Glucoseäquivalent}} [\mu\text{mol}]}{t_{\text{Inkubation}} [\text{min}] \times V_{\text{eingesetzter Kulturüberstand}} [\text{l}]} \end{aligned}$$

2.7.7 Bestimmung der CMC_{Case}-Aktivität in Kulturüberständen mittels Azo-CMC

Azo-CMC ist ein Substrat zum Nachweis von endo-1,4-β-Glucanaseaktivitäten (McCleary, 1980). Es handelt sich um teilweise depolymerisierte CMC, welche mit dem blauen Farbstoff Remazolbrillant Blau R konjugiert ist. Dabei trägt im Durchschnitt jede zwanzigste Glucoseeinheit ein Farbstoffmolekül. Durch β-Glucanasen bzw. Cellulasen wird das Polysaccharid in niedermolekulare Fragmente aufgespalten. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe eines Präzipitationspuffers abgestoppt, wobei ungeschnittenes Substrat ausfällt und die kleinen Spaltprodukte in Lösung bleiben. Die Intensität der Blaufärbung im Überstand, gemessen anhand der E₅₉₀, ist somit ein Maß für die Enzymaktivität der Probe. Anders als der DNSA-Test weist diese Methode nicht die reduzierenden Zucker nach, die bei der Hydrolyse von

Polysacchariden entstehen. Somit ist dieser Test auch anwendbar, wenn mit glucosehaltigen Kulturüberständen gearbeitet wird und somit der DNSA-Test nicht anwendbar ist. Die Testdurchführung erfolgte basierend auf den Herstellerangaben (Megazyme) wie folgt:

Nach einer Inkubationsdauer von 24 h wurde die OD_{600} der Expressionskulturen gemessen. Anschließend wurden 2 ml Kultur für 5 min bei 21 000 g zentrifugiert und der Kulturüberstand wurde vorsichtig geerntet, ohne das Zellpellet zu beschädigen. Um die Cel8A-Aktivität im Überstand zu messen, wurden 150 μ l einer 2 %-igen (w/v) Azo-CMC Lösung (siehe Tabelle 10) mit 150 μ l Kulturüberstand auf Eis gemischt. Anschließend wurden die Proben in einem Wasserbad bei 60 °C für 5 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion und zum Fällen von ungespaltenem Substrat wurden 750 μ l Präzipitationspuffer (siehe Tabelle 10) hinzugefügt. Die Proben wurden für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend für 10 min bei 1 000 g zentrifugiert um den Niederschlag zu entfernen. Anschließend wurde die E_{590} des Überstandes gemessen. Zur Herstellung der Blanklösung wurden 150 μ l Substratlösung mit 750 μ l Präzipitationspuffer gemischt und anschließend 150 μ l des Kulturüberstandes eines Stammes mit Leervektor (*P. polymyxa* DSM 292 pBACOV) hinzugegeben. Die Menge an Cel8A im Überstand wurde nun anhand einer Referenzkurve ausgewertet, die mit gereinigtem Cel8A (hergestellt in *E. coli* BL21 StarTM) aufgenommen wurde (siehe Tabelle 8). Die Rohdaten sowie die daraus erstellte Referenzkurve sind in Anhang A1 zu finden. Die spezifische Aktivität dieses Referenzzyms betrug 15,75 U/mg (ermittelt mit der DNSA-Methode und 0,5 % CMC als Substrat). Lagen die gemessenen Rohdaten über $E_{590} = 1,2$ und somit außerhalb des linearen Bereichs der Referenzkurve, so wurden die Überstände mit MilliQ-H₂O verdünnt und die Messung wiederholt.

2.7.8 Komplexierung von Cel8A und CipA6.2

Die Komplexierung von Cel8A und CipA6.2 erfolgte wie von Leis et al. (2017) beschrieben. Um die Komplexbildung von Cel8A mit CipA6.2 zu untersuchen, wurden 0,7 μ g CipA6.2 mit 15 μ g Cel8A (molares Verhältnis: 1:54) oder 9,4 μ g Cel8A (molares Verhältnis: 1:34) in einem Gesamtvolumen von 30 μ l in GeFi-Puffer (siehe Tabelle 10)

gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze per nativer PAGE (siehe Kapitel 2.7.3) aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Westernblot (siehe Kapitel 2.7.4) unter Verwendung des polyklonalen α -NC-Antikörpers sichtbar gemacht. Als Referenzen wurden Cel8A und CipA6.2 einzeln aufgetragen.

2.8 Sekretomanalyse mittels quantitativer LC-MS/MS

P. polymyxa DSM 292 pBACOV-SP_{LipB}-*cel8A* wurde in 20 ml Medium 2 bei 37 °C, 180 rpm kultiviert. Nach 24 h wurden 2 ml Kulturüberstand mittels Zentrifugation geerntet (5 min bei 21 100 g und 4 °C). Beim Abnehmen des Kulturüberstands wurde darauf geachtet, kein Zellmaterial aufzuwirbeln. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung für die LC-MS/MS bei -20 °C gelagert. Die Probenvorbereitung und die quantitative LC-MS/MS wurden von Stefanie Heinzlmeir, Tina Ludwig und Hermine Kienberger am BayBioMS (TUM, Freising-Weihenstephan) wie folgt durchgeführt:

Drei Replikate von je 30 µl Kulturüberstand wurden mit LDS Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific) gemischt, um sie für den In-Gel-Verdau vorzubereiten. Anschließend wurden die Proben mit 25 mM Dithiothreitol reduziert, für 10 min bei 95 °C erhitzt und mit 55 mM Chloroacetamid alkyliert. Die Proteine wurden auf ein 4-12 % NuPAGE-Gel (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen und etwa 1 cm in das Gel hineinlaufen gelassen, um die Probe zu konzentrieren, bevor der tryptische In-Gel-Verdau nach Shevchenko et al. (2006) durchgeführt wurde. Die erzeugten Peptide wurden aus dem Gel herausgelöst, vollständig getrocknet und in 12 µl 0,1 % Ameisensäure resuspendiert. Von dieser Suspension wurden pro MS-Messung 5 µl injiziert.

Für die LC-MS/MS wurde eine nanoLC-Ultra 1D+ HPLC-Anlage (Eksigent) verwendet, die online mit einem Q-Exactive HF Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) verbunden war. Die Peptide wurden zunächst mit einer Flussrate von 5 µl/min auf eine 2 cm Vorsäule (Innendurchmesser 75 µm, ReproSil Pur 120 ODS-3 5 µm, Dr. Maisch) aufgetragen. Anschließend wurden sie mit einer 40 cm langen, analytischen Hauptsäule (Innendurchmesser 75 µm, ReproSil-Gold 120 C18 3 µm, Dr. Maisch) aufgetrennt. Dabei betrug die Flussrate 300 nl/min mit einem Gradienten von 4 % - 32 % Puffer B (0,1 % Ameisensäure, 5 % DMSO in Acetonitril) in Puffer A (0,1 % Ameisensäure, 5 % DMSO) über einen Zeitraum von 120 min.

Das Eluat der Hauptsäule wurde mit einem Edelmetallemitter (Thermo Fisher Scientific) mit einer Spannung von 2,2 kV in das Massenspektrometer injiziert. Dabei betrug die Temperatur der Transferkapillare 275 °C. Das Q-Exaktive HF wurde im *data dependent*

acquisition Modus (DDA) betrieben, sodass es automatisch zwischen der Aufnahme von MS1 und MS2 Spektren wechselte. Für die Aufnahme der MS1 Spektren wurden Ionen mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) von 360 bis 1 300 (m/z) aufgezeichnet, bei einer Auflösung von 60 000 (bei m/z 200) und einer maximalen Injektionszeit von 50 ms bzw. einem AGC-Zielwert (*automatic gain control*) von 3×10^6 Teilchen. Bis zu 20 Vorläuferpeptide wurden isoliert (Isolationsfenster 1,7 m/z , maximale Injektionszeit 25 ms und AGC-Wert 3×10^5) und mittels *high-energy collision-induced dissociation* (HCD) fragmentiert (25 normalisierte Kollisionsenergie, NCE). Die Fragmente wurden mit einer Auflösung von 15 000 und einer Scan-Breite von 200 bis 2 000 m/z analysiert. Vorläuferpeptide, die nicht zugeordnet waren oder einfach oder mehr als +6-fach geladen waren, wurden ausgeschlossen. Die dynamische Ausschlussdauer von fragmentierten Vorläuferpeptiden war 20 s.

Peptide und Proteine wurden mittels der MaxQuant Software (version 1.5.7.4, Cox & Mann, 2008) identifiziert und quantifiziert. Dazu wurden die MS-Daten durch die Suchmaschine Andromeda (Cox et al., 2011) mit einer *P. polymyxa* DSM 292 Proteindatenbank (5 339 Proteinsequenzen) abgeglichen, die anhand der neuerstellten *P. polymyxa* DSM 292 Genomsequenz erstellt worden war (siehe Kapitel 3.2.1). Sie Sequenz von Cel8A wurde der Datenbank manuell hinzugefügt, um es vor dem Hintergrund des *P. polymyxa* Proteoms identifizieren zu können. Die MaxQuant-Suche wurde mit zwei variablen Modifikationen durchgeführt: Oxidation von Methionin und N-terminale Proteinacetylierung. Carbamidomethylierung von Cysteinen wurde als feste Modifikation eingestellt. Trypsin (Trypsin/P) wurde als proteolytisches Enzym festgelegt, wobei bis zu zwei ungespaltene Lys/Arg-Xaa-Bindungen pro Peptid zugelassen waren. Die markierungsfreie Quantifizierung (Cox et al., 2014) und Match-between-Runs (Matching-Zeitfenster 0,7 min, Alignment-Zeitfenster 20 min) waren aktiviert. Die Ergebnisse wurden auf eine Mindestlänge von 7 Aminosäuren und 1 % *protein false discovery rate* (FDR) gefiltert. Um die Konzentration der identifizierten Proteine relativ zu einander zu ermitteln, wurden die absoluten Intensitäten mit dem *intensity-based absolute quantification* Algorithmus (iBAQ, Schwanhäusser et al., 2011) abgeschätzt (Teil der MaxQuant-Software).

2.9 Enzymproduktion im Bioreaktor

Zur Vorbereitung des Bioreaktors (Gerätezusammenstellung: siehe Tabelle 3) wurde der Rührkessel mit Grundmedium (ohne Glucose und Antibiotikum) befüllt. Nach Anschluss der Sensoren (pH, pO₂, Temperatur, Schaum, ggf. OD) wurde die pH-Sonde kalibriert. Danach wurde der Rührkessel mitsamt der Sonden autoklaviert, die Steuereinheit angeschlossen und durch Zugabe von steriler Glucose-Lösung und Kanamycin das Medium fertiggestellt. Nach Kalibrierung der pO₂-Sonde war der Fermenter einsatzbereit. Der pH-Wert wurde bei Bedarf automatisch durch Zugabe von 25 % NH₄OH oder 25 % H₃PO₄ reguliert. Die Sauerstoffsättigung wurde durch zeitabhängige Anpassung der Belüftung bei konstanter Rührergeschwindigkeit reguliert.

Die Fermentation im Satzverfahren wurde mit *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} in Medium 0 (siehe Kapitel 3.2.6 bzw. Tabelle 9) durchgeführt. Zunächst wurde eine erste Vorkultur (20 ml LB, Inkubation über Nacht bei 37 °C, 180 rpm) angesetzt. Die zweite Vorkultur (50 ml Medium 0) wurde mit 5 ml der ersten Vorkultur angeimpft und für 5 h bei 37 °C, 180 rpm inkubiert, bis die Zellen die mittlere exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Nun wurde der Bioreaktor mit der gesamten zweiten Vorkultur angeimpft um die Fermentation zu starten. Der Bioreaktor bestand aus einer BIOSTAT B-MO Twin Versorgungseinheit und einem 2-Liter UniVessel Rührkessel (jeweils von Sartorius Stedim Biotech, Göttingen), der mit 1 l Medium 0 gefüllt war. Die Temperatur war auf 37 °C eingestellt, der pH-Wert auf 6,5. Die Rührgeschwindigkeit betrug 600 rpm. Die Belüftung mit sterilfiltrierter Druckluft erfolgte zunächst mit 4 l pro Minute, nach 18 h wurde der Luftstrom auf 5 l pro Minute erhöht. Die Gesamtlaufzeit der Fermentation im Satzverfahren betrug 42 h.

Ein Versuch zur Fermentation im Zulaufverfahren im 10 l-Maßstab wurde mit *P. polymyxa* DSM 292 pP03468-SP_{lipB-cel8A} in Medium 2 mit Hefeextrakt durchgeführt. Die verwendeten Prozessparameter sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Prozessparameter für die sekretorische Produktion von Cel8A im Zulaufverfahren (10 l-Maßstab). *P. polymyxa* DSM 292 pP03468-SP_{lipB}-*cel8A* diente als Produktionsorganismus, 10 µg/ml Kanamycin wurden zur Selektion verwendet.

SCHRITT	PROZESS-PARAMETER	WERT
1. Vorkultur	Medium	LB
	Animpfen	1 Kolonie
	Volumen	20 ml
	Gefäß	100 ml Erlenmeyerkolben
	Temperatur	37 °C
	Schütteln	180 rpm
	Dauer	über Nacht
2. Vorkultur	Medium	Medium 2 mit Hefeextrakt
	Animpfen	10 ml der 1. Vorkultur
	Volumen	5 % des maximalen Fermentervolumens, hier 500 ml
	Gefäß	Erlenmeyerkolben, zu 10 % gefüllt
	Temperatur	37 °C
	Schütteln	180 rpm
	Dauer	8 h
Fermenter	Medium	Medium 2 mit Hefeextrakt
	Startvolumen	50 % des Maximalvolumens
	Animpfen	5 % des Maximalvolumens = gesamte 2. Vorkultur
	Gefäß	Rührkesselreaktor, 10 Liter Maximalvolumen
	Belüftung	4-12 Liter pro Minute (zeitabhängig)
	Rührerdrehzahl	600 rpm
	Sauerstoffsättigung	pO ₂ > 55 %
	Fütterung	50 % (w/v) Glucoselösung
	Fütterungsrate	1 ml/min von t = 7 h bis t = 16 h, 16 ml bei t = 21,5 h, 49 ml bei t = 25,5 h
	Temperatur	37 °C
	pH	7,0
	Dauer	44,5 h

3. ERGEBNISSE

3.1 Genübertragung in Vertreter der Klasse Bacilli

Dank der rekombinanten DNA-Technologie existiert eine Vielzahl von Optionen zur Verbesserung der Eigenschaften eines Wirtsorganismus in biotechnologischen Anwendungen. Die Bandbreite reicht von der Überexpression einzelner Zielgene, dem Einbringen vollständiger Stoffwechselwege für das metabolic engineering, der Modifikation der Genregulation bis hin zum genome editing mittels gezielter Gen-Knockouts. Alle diese Anwendungen vereint die Notwendigkeit, dass das rekombinante DNA-Konstrukt in den Empfängerstamm übertragen werden muss. Dieser Abschnitt beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung von pBACOV, einem leicht zu übertragenden Expressionsplasmid mit breitem Wirtsspektrum.

3.1.1 Vorüberlegungen zur Konstruktion eines neuen Expressionsplasmides mit breiter Anwendbarkeit in Bazillen

Bacillus subtilis war die erste *Bacillus*-Spezies, die erfolgreich mit gereinigter DNA transformiert werden konnte (Spizizen, 1958) und ist somit nach *Streptococcus pneumoniae* (Dawson & Sia, 1931; Griffith, 1928) einer der ersten Organismen, für die ein Mechanismus des horizontalen Gentransfers beschrieben wurde.

Heutzutage stehen mit der rekombinanten DNA Technologie eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung, um die Eigenschaften eines Mikroorganismus durch DNA-Transfer gezielt zu verändern. Während für einige *B. subtilis*-Stämme effiziente Transformationsprotokolle und Methoden zur Manipulation des Genoms existieren, gestalten sich derartige Anwendungen in vielen anderen *Bacillus*-Arten schwierig. Besonders Naturisolate und Wildtyp-Stämme erweisen sich als schwer zugänglich für die genetische Modifikation mit gängigen Methoden (Hertel et al., 2015; Schallmeyer et al., 2004). Viele dieser Methoden für den Plasmidtransfer in Bakterien beruhen auf

spezialisierten Protokollen, die für jeden Stamm neu angepasst werden müssen. So müssen beispielsweise bei den gängigsten Methoden wie Chemotransformation oder Elektroporation, aber auch bei seltener eingesetzten Verfahren (wie z. B. Protoplastentransformation), zunächst aufwändig kompetente Zellen hergestellt werden, die für das jeweilige Verfahren geeignet sind und sehr empfindlich sein können. Diese Tatsache erschwert die gleichzeitige Untersuchung der Transformierbarkeit mehrerer, und besonders neuer Kandidatenstämme.

Um dieses Problem zu lösen, sollte in der vorliegenden Arbeit ein universell einsetzbares Transformationssystem entwickelt werden. Die Wahl fiel auf ein konjugatives Transformationssystem, da hierfür keine kompetenten Zellen vorbereitet werden müssen. Zudem ermöglicht die Konjugation den Plasmidtransfer zwischen Bakterien über Artgrenzen hinweg: Wird *E. coli* als Donor verwendet, ist eine Übertragung sowohl zu anderen Gram-negativen Spezies als auch zu Gram-positiven Empfängern möglich (Formal et al., 1970; Johnson & Baron, 1969; Schäfer et al., 1990; Trieu-Cuot et al., 1987). Somit lieferte die Konjugation eine ideale Grundlage für ein universell einsetzbares Transformationssystem. Ein entsprechendes mobilisierbares Expressionsplasmid sollte idealerweise folgende Eigenschaften besitzen:

- (i) Ein **Transferursprung und Konjugationsapparat mit größtmöglichem Wirtsspektrum** gewährleistet einen effizienten Transfer des Plasmids von *E. coli* zum gewünschten Empfängerorganismus.
- (ii) Ein **Replikationsursprung mit breitem Wirtsspektrum** stellt sicher, dass das Plasmid in vielen verschiedenen Organismen angewendet werden kann.
- (iii) **Aufeinander abgestimmte Replikations- und Transferursprünge** garantieren eine stabile, komplikationsfreie Replikation und Transkonjugation.
- (iv) Ein **Shuttle-Plasmid**, das je einen Replikationsursprung und Selektionsmarker für *E. coli* und den *Bacillus*-Empfängerorganismus enthält, vereint die einfache Klonierung in *E. coli* mit der Anwendbarkeit in Bazillen.
- (v) Eine **Expressionskassette mit multipler Klonierungsstelle** ermöglicht das

einfache Einfügen eines Zielgens und die anschließende Expression.

Damit ein Plasmid erfolgreich mobilisiert werden kann, kommt im Gefüge der einzelnen Schritte der Konjugation der Initiation der konjugativen DNA-Synthese eine besondere Bedeutung zu. Das TraJ-Protein erkennt mit hoher Präzision den Transferursprung (*oriT*), es kommt zur Bildung des TraJ-*oriT*-Komplexes. Dieser Komplex wird durch TraI erkannt, eine Nuclease, die einen Einzelstrangbruch an der *nic*-Stelle im Transferursprung erzeugt. Der so frei werdende DNA-Einzelstrang wird dann über einen *rolling-circle*-Mechanismus repliziert und in die Empfängerzelle übertragen (Pansegrau et al., 1990). Somit sind TraJ und *oriT* essenziell für die Initiation des konjugativen Plasmidtransfers. Ein Plasmid, das neben *oriT* nur einen Teil oder keine der darüberhinaus für die Konjugation nötigen Gene trägt, ist nicht selbst-übertragbar, kann aber durch ein Helferplasmid mobilisiert werden, das diese Funktionen zur Verfügung stellt. Somit sind *oriT* und *traJ* ausreichende Bedingungen für einen konjugativen Plasmidtransfer, sofern ein geeignetes Helfersystem zur Verfügung steht. Eine Möglichkeit, ein mobilisierbares Plasmid zu erzeugen, besteht darin, *oriT* und *traJ* aus einem Plasmid der RK2-Familie einzufügen. Das RK2-Plasmid, auch bekannt als RP4 (Burkardt et al., 1979), zeichnet sich durch sein großes Wirtsspektrum aus (Jain & Srivastava, 2013; Pansegrau et al., 1994). Mit dem Plasmid pRK2013, welches auf RK2 beruht (Figurski & Helinski, 1979), steht ein entsprechendes Helferplasmid zur Übertragung mobilisierbarer Plasmide mit *oriT/traJ* des RK2-Typs zur Verfügung. Somit erfüllt ein Plasmid mit *oriT/traJ* des RK2-Typs in Kombination mit pRK2013 die in Punkt (i) genannte Anforderung.

Da die Übertragung bei der Konjugation nach dem *rolling-circle*-Mechanismus funktioniert, wurde angenommen, dass ein Plasmid, das effizient per Konjugation übertragen werden soll, selbst über den *rolling-circle*-Mechanismus repliziert werden sollte. Ein Beispiel für ein Plasmid mit *rolling-circle*-Replikationsmechanismus ist pUB110 aus *Staphylococcus aureus* (Boe et al., 1989; Gruss & Ehrlich, 1989; Gryczan et al., 1978). Dieses Plasmid kann in verschiedene *Firmicutes*-Arten übertragen werden und dort replizieren, wie z. B. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* (Keggins et al., 1978) oder *Clostridium acetobutylicum* (Lin & Blaschek, 1984). Somit verfügt pUB110 über

ein großes Wirtsspektrum und erfüllt die oben unter Punkt (ii) und (iii) genannten Anforderungen.

Um für die Klonierung und Vervielfältigung des Plasmids auf den etablierten Wirt *E. coli* zurückgreifen zu können, kann ein *Shuttle*-Plasmid verwendet werden. Das kommerziell verfügbare Plasmid pBE-S (TaKaRa Bio) ist ein entsprechender Shuttle-Vektor, der neben dem pUB-Replikationsursprung und dem *kanR*-Selektionsmarker von pUB110 für Bazillen auch den ColE1-Replikationsursprung und den Selektionsmarker *ampR* des pUC-Plasmids für *E. coli* enthält. Darüber hinaus besitzt pBE-S eine Expressionskassette für sekretorische Expression in *B. subtilis*, bestehend aus dem Promotor P_{aprE} , dem Signalpeptid SP_{aprE} , einer multiplen Klonierungsstelle und einer kodierenden Sequenz für einen C-terminalen Hexahistidin-*tag* (*His₆-tag*) für die Proteinreinigung. Zudem stellt TaKaRa Bio für pBE-S ein Kit zur Durchmusterung einer Signalpeptidbibliothek zur Verfügung. Da pBE-S somit die Anforderungen (iv) und (v) erfüllt, wurde es als Ausgangsvektor für die Konstruktion des neuen konjugativen Expressionsplasmids ausgewählt.

3.1.2 pBACOV, ein mobilisierbarer *Shuttle*-Vektor für konjugative Genübertragung

Die Überlegungen in Kapitel 3.1.1 lieferten die Basis für den Aufbau des neuen, mobilisierbaren Expressionsplasmids für Bazillen, genannt pBACOV (*Bacillus conjugation vector*). pBACOV wurde basierend auf pBE-S konstruiert. Dabei wurden von pBE-S der pUC-Anteil (bp 1645-3556) für die Vermehrung des Plasmids in *E. coli* sowie der pUB110-Anteil (bp 3557-5936) für Replikation und Selektion in Bazillen verwendet. Darüber hinaus wurde die Expressionskassette aus pBE-S (bp 5937-517) übernommen. Durch eine Sequenzanalyse von pBE-S wurde im Bereich von bp 486-519 eine Haarnadelstruktur (*stem loop*) identifiziert, auf die eine Sequenzabfolge von fünf T-Nukleotiden folgt. Bei dieser Struktur handelt es sich möglicherweise um die Sequenz für einen rho-unabhängigen Transkriptionsterminator, weshalb dieser Bereich ebenfalls erhalten wurde. Bei der Erzeugung von pBACOV wurde darüber hinaus ein nicht annotiertes Segment ohne offensichtliche Funktion aus pBE-S (bp 580-1642) entfernt und

eine *oriT/traJ*-Region vom RK2-Typ zwischen den beiden Antibiotikaresistenzgenen eingefügt.

pBACOV wurde mittels *Gibson Assembly* (Gibson et al., 2009) aus drei überlappenden PCR-Produkten erzeugt (Abbildung 6). Fragment 1 beinhaltet den pUB110-Anteil und die Expressionskassette (bp 3453-557 von pBE-S) und wurde mittels der Primer pUB110_backbone_fw und pUB110_backbone_rv mit pBE-S als Vorlage erstellt. Fragment 2 mit dem pUC-Anteil von pBE-S (bp 1642-3452) wurde mit den Primern Fw_pUC_for_Gibson und Rv_pUC_from_pBE-S generiert, wobei wiederum pBE-S als Matrize diente. Fragment 3, welches den RK2-Konjugationsursprung *oriT/traJ* enthält, wurde mit den Primern oriT_traJ_fw und oriT_traJ_rv und dem Plasmid pKVM4 als Vorlage vervielfältigt. Bei pKVM4 handelt es sich um ein mobilisierbares Plasmid zur Erzeugung markerfreier Gendelektionen in *B. licheniformis* (Kostner et al., 2017). Um die Kompatibilität von pBACOV mit der Signalpeptid-Bibliothek aus dem *B. subtilis* Secretory Protein Expression System Kit (TaKaRa Bio) zu bewahren, wurde die *EagI*-Restriktionsschnittstelle im *traJ*-Gen mittels zweistufiger QuikChange Mutagenese entfernt (Wang & Malcolm, 1999). Dafür wurden die Primer QC_g2015t_1 und QC_g2015t_2 verwendet. So wurde die stille Mutation g2015t erzeugt, welche das ursprüngliche Alanin-Codon GCC durch GCA ersetzt und gleichzeitig die *EagI*-Schnittstelle durch Mutation von CGGCCG zu CTGCCG entfernt. Die erwartete Sequenz von pBACOV wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Um die Funktionalität des P_{aprE} -Promotors in verschiedenen Bazillen untersuchen zu können, wurde *sfGFP* als Reporter gen ausgewählt. *sfGFP* kodiert das *super-folder green fluorescent protein* (Pédelacq et al., 2006), welches sich durch Fluoreszenzmessung leicht nachweisen lässt. Das *sfGFP*-Gen wurde unter Verwendung der Primer sfGFP-fw und sfGFP-rv und dem Plasmid pET28A-*sfGFP* (zur Verfügung gestellt von Dr. Mark Teese, Schanzenbach et al. 2017) als Vorlage vervielfältigt und mittels Gibson Assembly in pBACOV eingefügt, während gleichzeitig die für das Signalpeptid SP_{aprE} kodierende Sequenz entfernt wurde. Somit wird sfGFP intrazellulär produziert, was einen Vergleich der Promotorstärke zwischen einzelnen Stämmen ermöglicht, ohne dass weitere

Einflüsse, wie z.B. durch die Sekretion, berücksichtigt werden müssen. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt. Somit standen nun mit pBACOV und pBACOV-*sfGFP* neue, mobilisierbare Expressionsvektoren für Bazillen zur Verfügung.

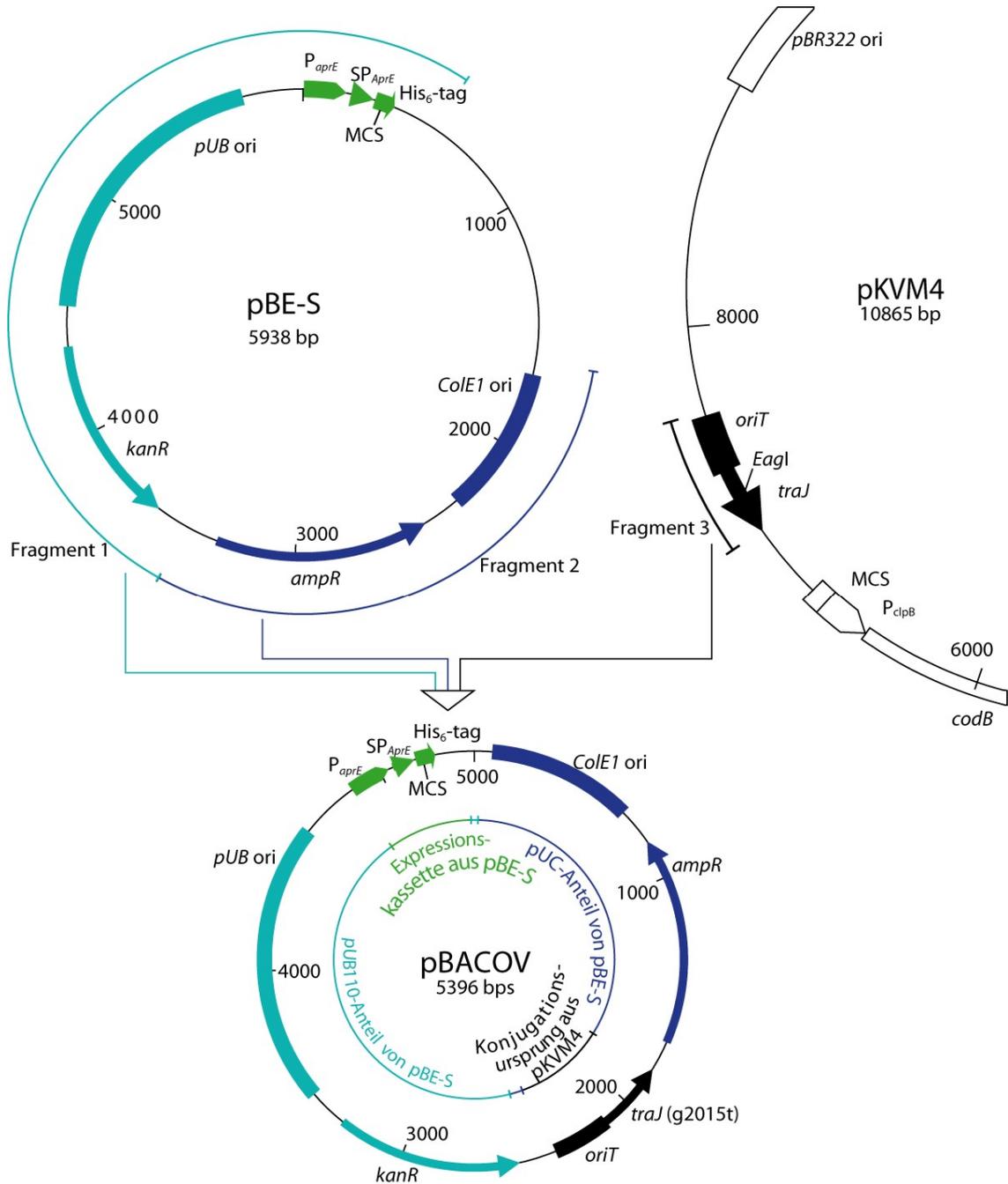


Abbildung 6: Schema für die Klonierung von pBACOV aus pBE-S und pKVM4. Hellblau: Teile aus pUB110 für Replikation und Selektion in Bazillen; dunkelblau: Elemente aus pUC für Replikation und Selektion in *E. coli*; schwarz: Konjugationsursprung vom RK2-Typ zur Mobilisierung des Plasmids; grün: Expressionskassette aus pBE-S mit Promotor (*P_{aprE}*), Signalpeptid (*SP_{AprE}*), multipler Klonierungsstelle (*MCS*) und Hexahistidin-tag (*His₆-tag*). Codierende Sequenzen und Gene sind als Pfeile in Leserichtung dargestellt, Kästchen stellen Replikationsursprünge dar, Promotoren werden durch Kästchen mit Spitze abgebildet. Die *EagI*-Restriktionsschnittstelle in *traJ* von pKVM4 wurde in pBACOV durch QuikChange-Mutagenese entfernt (g2015t).

3.1.3 Auswahl geeigneter Bazillen als Empfängerorganismen

Um die breite Anwendbarkeit von pBACOV zu demonstrieren, wurde die Übertragung des Plasmids in eine größtmögliche Anzahl an Bazillen untersucht. Dabei wurden als Empfänger nicht nur bekannte *Bacillus*-Spezies ausgewählt, die bereits für die industrielle Enzymproduktion eingesetzt werden, sondern auch Arten, die unter anderem in Ermangelung geeigneter gentechnischer Methoden bisher noch nicht als Produktionsstämme verwendet wurden. Ein erfolgreicher Transfer von pBACOV in derartige Stämme würde ihre grundsätzliche genetische Zugänglichkeit zeigen, wodurch eine Grundlage für die Optimierung und Ausnützung ihrer Eigenschaften in biotechnologischen Anwendungen wie der Enzymproduktion geschaffen würde.

Die triparentale Konjugation wurde als Methode für den Transfer von pBACOV ausgewählt. Dabei werden der Empfängerstamm (z. B. *Bacillus sp.*), der Donorstamm (*E. coli* mit dem zu übertragenden Plasmid) und der Helferstamm (*E. coli* HB101 pRK2013) gemischt und inkubiert. Anschließend wird das Zellgemisch auf Selektionsagar übertragen. Dieser enthält Kanamycin (Kan) zur Selektion auf erfolgreich transkonjugierte Empfängerbakterien und Polymyxin B (Pol) zur Selektion gegen *E. coli* (siehe Kapitel 2.6.15 sowie Abbildung 5). Grundvoraussetzungen eines potentiellen Akzeptorstammes waren somit Kanamycin-Sensitivität und Polymyxin B-Resistenz.

Diese Eigenschaften wurden bei 28 ausgewählten Spezies aus den Gattungen *Bacillus*, *Fictibacillus* und *Paenibacillus* aus der Stammsammlung des Lehrstuhl für Mikrobiologie (Prof. Liebl, TUM) und der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobielle Ökologie (Prof. Scherer, TUM) (siehe Tabelle 12) untersucht. Dazu wurden die Stämme auf LB-Agarplatten mit 10 µg/ml Kan bzw. 40 µg/ml Pol ausgestrichen und das Wachstum nach Inkubation über Nacht festgestellt. Es wurden sieben Stämme identifiziert, die sowohl resistent gegen 40 µg/ml Pol als auch sensitiv gegen 10 µg/ml Kan waren (Tabelle 29). Bei Stämmen, die nur eine der beiden erforderlichen Eigenschaften besaßen (Pol-Resistenz oder Kan-Sensitivität), wurde für das jeweils andere Antibiotikum mittels Reihenverdünnungstest die minimale Hemmkonzentration ermittelt (Tabelle 29).

Tabelle 29: Wachstum in Abhängigkeit von Kanamycin (Kan oder Polymyxin B (Pol)). Die minimalen Hemmkonzentrationen wurden mittels Reihenverdünnungstests nach einer Inkubationszeit von 24 h ermittelt. Fett gedruckte Spezies wurden als Akzeptorstämme für Transkonjugationsversuche mit pBACOV-*sfGFP* ausgewählt. Typstämme sind durch ein hochgestelltes ^T gekennzeichnet. +++: starkes Wachstum, ++ mittleres Wachstum, +: schwaches aber nachweisbares Wachstum, -: kein Wachstum, *: mittleres Wachstum nach 48 h feststellbar.

STÄMME MIT RESISTENZ GEGEN 40 µG/ML POL UND SENSITIVITÄT GEGEN 10 µG/ML KAN					
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 ^T					
<i>B. pumilus</i> DSM 27 ^T					
<i>B. sonorensis</i> DSM 13779 ^T					
<i>P. polymyxa</i> DSM 36 ^T					
<i>P. polymyxa</i> DSM 292					
<i>P. polymyxa</i> DSM 356					
<i>P. polymyxa</i> DSM 365					
WACHSTUM VON POL-RESISTENTEN (40 µG/ML) STÄMMEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN KAN-KONZENTRATIONEN					
	Kan [µg/ml]				
	12.5	25	50	100	200
<i>B. mycoides</i> DSM 2048 ^T	+++	++	-	-	-
<i>B. megaterium</i> DSM 32 ^T	+	+	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> DSM 2046 ^T	+++	++	+	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 ^T	+++	+	+	+	+
<i>B. pocheonensis</i> DSM 18135 ^T	+++	++	+	+	-
<i>B. pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	+	-	-	-	-
WACHSTUM VON KAN-SENSITIVEN (10 µG/ML) STÄMMEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN POL-KONZENTRATIONEN					
	Pol [µg/ml]				
	2.5	5	10	20	40
<i>B.adius</i> DSM 23 ^T	-	-	-	-	-
<i>B. bataviensis</i> WS4576	-	-	-	-	-
<i>B. cohnii</i> DSM 6307 ^T	-	-	-	-	-
<i>B. flexus</i> DSM 1320 ^T	-	-	-	-	-
<i>B. foraminis</i> DSM 19613 ^T	-	-	-	-	-
<i>B. ginsengihumi</i> WS8095	-	-	-	-	-
<i>B. horikoshii</i> WS2157	-	-	-	-	-
<i>B. mojavensis</i> DSM 9205 ^T	+++	+++	+++	-	-
<i>B. niabensis</i> WS9147	-	-	-	-	-
<i>B. niacini</i> WS4575	-	-	-	-	-
<i>B. oleronius</i> WS8036	-/+++ *	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> RIK1285	+++	+++	-	-	-
<i>B. vallismortis</i> DSM 11031 ^T	+++	+++	+++	++	-

<i>Fictibacillus arsenicus</i> WS4538	-	-	-	-	-
STAMM MIT RESISTENZ GEGEN 10 µG/ML KANAMYCIN UND SENSITIVITÄT GEGEN 40 µG/ML POLYMYXIN B					
<i>B. clausii</i> DSM 8716 ^T					
NACHWEIS DER POL-SENSITIVITÄT DER VERWENDETEN <i>E. COLI</i> STÄMME					
	Pol [µg/ml]				
	2.5	5	10	20	40
<i>E. coli</i> TOP10	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> HB101 pRK2013	-	-	-	-	-

So wurden insgesamt 14 Stämme identifiziert, die als Akzeptoren für Transkonjugationsversuche mit pBACOV-*sfGFP* in Frage kamen, wobei die Konzentrationen der Antibiotika im Selektionsagar zum Teil angepasst werden mussten. Für *B. licheniformis* DSM 13, *B. pumilus* DSM 27, *B. sonorensis* DSM 13779 und *P. polymyxa* DSM 356 (stellvertretend für alle vier getesteten *P. polymyxa* Stämme) wurden 10 µg/ml Kan und 40 µg/ml Pol eingesetzt. Bei *B. mycooides* DSM 2048, *B. megaterium* DSM 32 und *B. pseudomycooides* DSM 12442 wurde die Kan-Konzentration erhöht (verwendete Konzentrationen: Pol: 40 µg/ml, Kan: 50 µg/ml), während bei *B. subtilis* RIK1285, *B. mojavensis* DSM 9205, *B. vallismortis* DSM 11031 (Pol: 10 µg/ml, Kan: 10 µg/ml) und *B. oleronius* WS8036 (Pol: 2.5 µg/ml, Kan: 10 µg/ml) die Pol-Konzentration verringert wurde.

Zusätzlich zu diesen Stämmen wurde in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB) in Potsdam auch die Übertragbarkeit von pBACOV in milchsäurebildende Bakterien getestet. Am ATB werden Stämme eingesetzt, die sich durch eine gute Produktionsleistung von nahezu isomerenreiner (> 99 %) Milchsäure aus verschiedenen technischen Substraten auszeichnen. Dabei werden *B. coagulans*- und *Lactococcus lactis*-Isolate für die Produktion von L-Milchsäure verwendet, während *Lactobacillus sp.* für die Produktion von D-Milchsäure zum Einsatz kommen.

Die milchsäurebildenden Stämme des ATB werden routinemäßig in MRS-Medium kultiviert (De Man et al., 1960). Dieses speziell für LactoBazillen entwickelte Medium inhibiert das Wachstum von *E. coli*, weshalb bei Konjugationsversuchen auf die Verwendung von Pol im Selektionsagar verzichtet werden kann. Die Eigenschaften dieser Stämme sind in Tabelle 30 dargestellt.

Die Stämme A159 und A160 waren von Seiten des ATB zunächst nur als *Lactobacillus sp.* charakterisiert. Um auch mit diesen Stämmen gentechnisch arbeiten zu können, wurde zur Artbestimmung die Sequenz des 16S-rRNA-Gens ermittelt. So konnten beide Isolate der Spezies *Lactobacillus delbrueckii* zugeordnet werden (Sequenzidentität > 99 %). Entsprechend standen nun sechs weitere Stämme für Transkonjugationsversuche mit pBACOV-*sfGFP* zur Verfügung.

Tabelle 30: Eigenschaften ausgewählter Milchsäurebildner des ATB. Daten zur Verfügung gestellt von Roland Schneider, ATB. Das Wachstum mit Kanamycin wurde nach einer Inkubationszeit von 48 h bewertet. T_{Opt}: optimale Wachstumstemperatur.

STAMM	T _{OPT}	IOSLIERT AUS	GEBILDETES MILCHSÄURE- ISOMER	BESONDERHEIT	WACHSTUM KAN [µG/ML]		
					10	50	200
<i>B. coagulans</i> A59	52 °C	Roggenkorn	L(+)	sehr gute Amylase-Aktivität	+	-	-
<i>B. coagulans</i> A203	52 °C	Hühnerfutter	L(+)	Resistenz gegen HMF und Furfural, gute Verwertung von Hemicellulose-Zuckern	+	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> A159	52 °C	Kartoffel-fruchtwasser	D(-)	thermophiler D-Milchsäurebildner	+	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> A160	52 °C	Kartoffel-fruchtwasser	D(-)	thermophiler D-Milchsäurebildner	+	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> A38	30 °C	Luzernenpressrückstand	L(+)	Alternative zu <i>B. coagulans</i>	+	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> A55	30 °C	Kartoffel	L(+)	Alternative zu <i>B. coagulans</i>	+	+	-

3.1.4 Konjugative Übertragung von pBACOV-*sfGFP*

Das Plasmid pBACOV-*sfGFP* wurde eingesetzt, um (i) den Plasmidtransfer in einer Vielzahl verschiedener Bazillen unter Verwendung eines einzigen Routineprotokolls zu untersuchen und (ii) die Expression des heterologen Reportergens *sfGFP* zu analysieren.

pBACOV-*sfGFP* wurde durch triparentale Konjugation von *E. coli* TOP10 auf verschiedene *Bacillus* Akzeptorstämme übertragen, wobei *E. coli* HB101 pRK2013 (Ditta et al., 1980; Figurski & Helinski, 1979) als Helferstamm diente. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 2.6.15 beschrieben. Das Helferplasmid pRK2013 ist ein selbst-übertragendes Plasmid (Größe: 48 kbp), das das Transfersystem von RK2 enthält und somit effizient zwischen Gram-negativen Bakterien übertragen werden kann. Darüber hinaus kann es den konjugativen Transfer nicht verwandter, mobilisierbarer Plasmide initiieren (Ely, 1985; Figurski & Helinski, 1979). Es wird angenommen, dass der Mechanismus für den triparentalen Plasmidtransfer in zwei Schritten abläuft: Zunächst wird das Helferplasmid pRK2013 auf den Donorstamm übertragen, welcher das mobilisierbare, aber sich nicht selbst-übertragende Expressionsplasmid pBACOV trägt. Nun können die für die Konjugation benötigten Gene im Donorstamm exprimiert werden, wodurch das Expressionsplasmid in den Akzeptorstamm übertragen werden kann.

Pro Akzeptorstamm wurden drei Konjugationsansätze vorbereitet. Diese enthielten entweder Zellen aus den stationären Vorkulturen, aus der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} zwischen 0,6 und 0,9) oder aus der späten exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} \geq 1.2$). Nach Inkubation der Selektionsplatten wurden gewachsene Kolonien gezählt und korrekte Transkonjuganten mittels analytischer PCR unter Verwendung der plasmidspezifischen Primer pBESCI-seq_4894fw und pBESCI-Seq-rv identifiziert. Zudem wurde die 16S rRNA-Gensequenz ausgewählter Transkonjuganten ermittelt, um die richtige Artzugehörigkeit der Klone nach der Selektion und Gegenselektion zu überprüfen. Dies war besonders bei *B. Mojavensis*, *B. vallismortis* und *B. oleronius* von Bedeutung, also jenen Stämmen, die bei verringerten Pol-Konzentrationen kultiviert werden mussten, um ein mögliches Wachstum von *E. coli* unter diesen milderen Gegenselektionsbedingungen auszuschließen. Darüber hinaus

wurde ein besonderes Augenmerk auf die Koloniemorphologie gelegt.

Um die Effizienz der Transkonjugation abzuschätzen, wurden nur Kolonien mit der arttypischen Morphologie berücksichtigt. Die für Konjugationen mit *B. mojavensis* und *B. vallismortis* eingesetzte Pol-Konzentration von 10 µg/ml konnte das Wachstum von *E. coli* auf dem Selektionsagar nicht vollständig inhibieren. Infolgedessen handelte es sich hier bei einigen der getesteten Kolonien um *E. coli*. Zur Unterscheidung war die Koloniemorphologie als Vorauswahlkriterium für transkonjugierte Klone hilfreich, bevor diese mittels 16S rRNA-Gensequenzierung eindeutig identifiziert wurden. Im Falle von *B. oleronius* stellte sich trotzdem heraus, dass es sich bei allen von den Selektionsplatten (Pol-Konzentration: 2,5 µg/ml) ausgewählten Kolonien um *E. coli* handelte. Dies weist darauf hin, dass eine effektive Gegenselektion auf diesen Selektionsplatten nicht möglich war, obwohl die minimale Hemmkonzentration von Pol für *E. coli* in Flüssigkulturen unter 2,5 µg/ml lag. Somit war die Übertragung von pBACOV-*sfGFP* auf *B. oleronius* nicht nachweisbar. Der Transfer von pBACOV-*sfGFP* auf alle anderen ausgewählten Akzeptorstämme aus Tabelle 29 war hingegen erfolgreich, mit der Ausnahme von *B. megaterium*.

Die bei der Transkonjugation erhaltene Anzahl an Kolonien auf den Selektionsplatten schwankte sowohl zwischen den einzelnen Arten als auch zwischen den drei Konjugationsansätzen einer Art, lag aber stets über 25 (Gesamtzahl der Kolonien auf allen Selektionsplatten einer Spezies). Beispiele für erhaltene Koloniezahlen sind in Tabelle 31 aufgeführt. Die meisten Kolonien wurden mit *P. polymyxa* DSM 356 (Koloniezahl: 1750) und *B. subtilis* RIK1285 (mehrere Tausend Kolonien sowie teilweise konfluentes Wachstum) erhalten.

Tabelle 31: Ausbeute erhaltener Kolonien ausgewählter Transkonjugationsversuche. Es wurden nur Kolonien mit der arttypischen Morphologie des jeweiligen Akzeptorstammes gezählt. Auf Selektionsplatten mit Pol-Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ wurde zusätzlich Wachstum von *E. coli* festgestellt. *: Bei *B. subtilis* wurden mehrere Tausend Einzelkolonien und teilweise konfluentes Wachstum festgestellt. **: Bei *B. mycoides* und *B. pseudomycoides* konnte die genaue Koloniezahl aufgrund des konfluenten Wachstums großer, mycelartiger Kolonien (Durchmesser $> 10 \text{ mm}$) nicht bestimmt werden (n. b.).

ART	ANZAHL ARTTYPISCHER KOLONIEN
<i>B. subtilis</i> RIK1285	$> 5\,000$ *
<i>P. polymyxa</i> DSM 356	1 750
<i>B. vallismortis</i> DSM 11031 ^T	849
<i>B. pumilus</i> DSM 27 ^T	655
<i>B. mojavensis</i> DSM 9205 ^T	574
<i>B. sonorensis</i> DSM 13779 ^T	178
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 ^T	37
<i>B. mycoides</i> DSM 2048 ^T	n. b. **
<i>B. pseudomycoides</i> DSM 12442 ^T	n. b. **
<i>B. oleronius</i> WS8036	0
<i>B. megaterium</i> DSM 32 ^T	0

Um die Nützlichkeit von pBACOV als Expressionsplasmid mit breitem Wirtsspektrum zu zeigen, wurde die sfGFP-Produktion ausgewählter pBACOV-*sfGFP*-Transkonjuganten untersucht. Als Negativkontrollen kamen die entsprechenden Wildtypstämme ohne pBACOV-*sfGFP* zum Einsatz. Zur Messung der *sfGFP*-Expression wurden die pBACOV-*sfGFP*-Transkonjuganten und die entsprechenden Negativkontrollstämme in SM-Cas Medium inkubiert. Dieses Medium zeigt im Gegensatz zu beispielsweise LB Medium keine messbare Autofluoreszenz, welche sich nachteilig auf die Messung der sfGFP-Fluoreszenz auswirken würde. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Kulturen bis zu einer OD_{600} von etwa 1 verdünnt und anschließend die Fluoreszenz gemessen (Anregung: 470 nm, Emission: 520 nm). Die jeweilige gemessene relative Fluoreszenz, normalisiert auf die OD_{600} der Kultur (Fluoreszenzintensität/ OD_{600}), ist in Tabelle 32 dargestellt. Bei acht der neun Kulturen mit pBACOV-*sfGFP* war sfGFP-Fluoreszenz messbar. Dies zeigt, dass der P_{aprE} -Promotor in diesen Bakterien funktional ist. *B. sonorensis* war die einzige Art, bei der auch transkonjugierte Zellen keine messbare sfGFP-Fluoreszenz zeigten. Somit kann P_{aprE} in beinahe 90 % der getesteten Stämme zur Expression heterologer Gene verwendet

werden. Die stärkste relative Fluoreszenz wurde bei *B. mojavensis* festgestellt. Die sfGFP-Fluoreszenz ausgewählter Stämme wurde auch mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Aufnahmen von *B. licheniformis*, *B. mojavensis* und *P. polymyxa* DSM 356 mit oder ohne pBACOV-sfGFP sind in Abbildung 7 dargestellt.

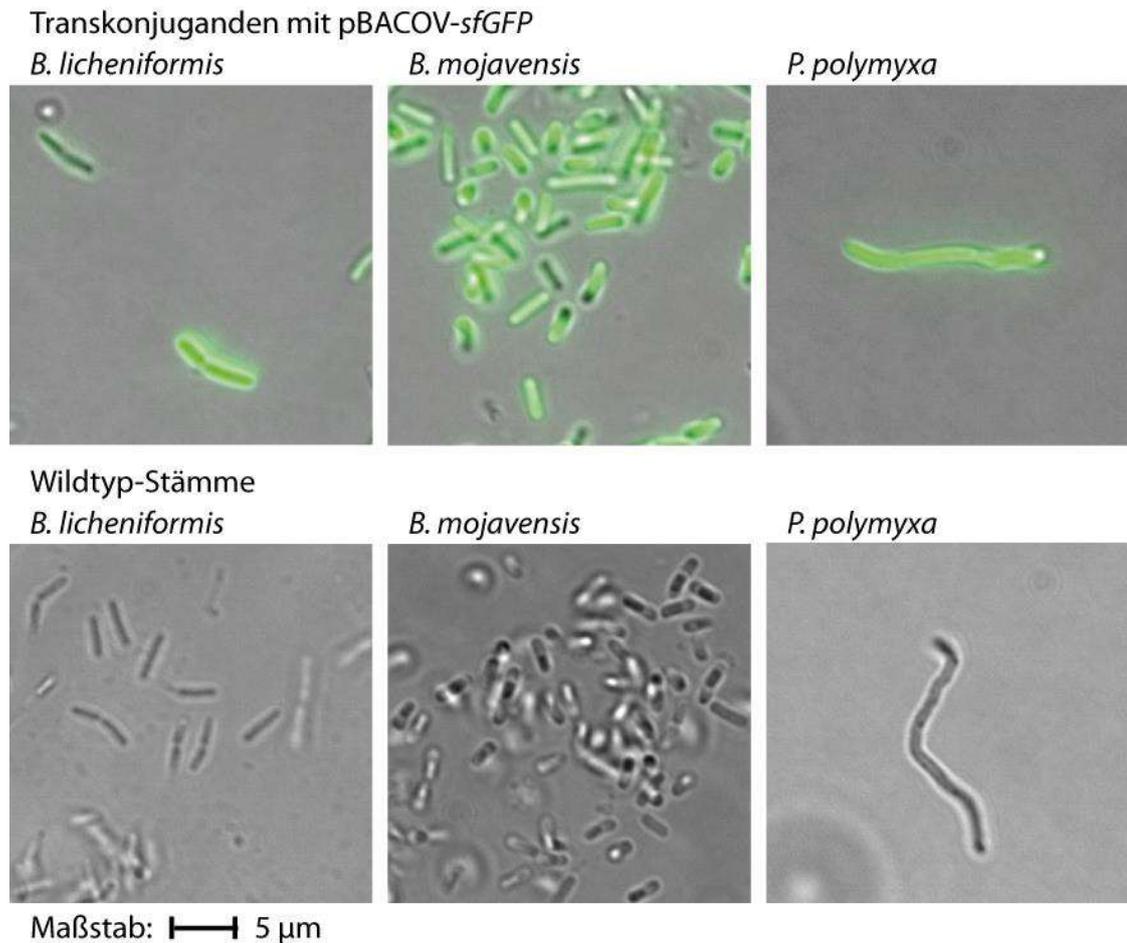


Abbildung 7: Visualisierung der sfGFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie. Obere Reihe von links nach rechts: *B. licheniformis* DSM 13^T, *B. mojavensis* DSM 9205^T und *P. polymyxa* DSM 356 Transkonjuganten mit pBACOV-sfGFP. Untere Reihe von links nach rechts: Wildtypstämme von *B. licheniformis* DSM 13^T, *B. mojavensis* DSM 9205^T und *P. polymyxa* DSM 356. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. Zur Aufnahme wurde ein Zeiss Axio Imager.M1 Fluoreszenzmikroskop mit einer Zeiss AxioCam MRm Kamera verwendet.

Tabelle 32: sfGFP-Fluoreszenz verschiedener Bakterienarten mit oder ohne pBACOV-sfGFP bezogen auf *B. subtilis* RIK1285 pBACOV-sfGFP. Die Stämme wurden für 24 h bei 37 °C, 180 rpm (*B. mycooides*: 72 h bei 30 °C, 180 rpm) in SM-Cas Medium inkubiert und anschließend auf OD₆₀₀ ≈ 1 verdünnt. Die Fluoreszenz (Anregung: 470 nm, Emission: 520 nm) und die OD₆₀₀ wurden gemessen und daraus die relative Fluoreszenz (Fluoreszenzintensität/OD₆₀₀) berechnet. Der Fluoreszenzwert von *B. subtilis* RIK1285 pBACOV-sfGFP wurde als 100 % definiert. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von Dreifachmessungen. n. d.: nicht detektierbar (relative Fluoreszenz < 0,7 %). *: Die OD₆₀₀ des *B. pumilus* Wildtyps ohne pBACOV-sfGFP war nach der 24-stündigen Inkubation < 1, weshalb diese Kultur unverdünnt für die Fluoreszenzmessung verwendet wurde.

ART	RELATIVE FLUORESCENZ [%]	
	Mit pBACOV-sfGFP	Wildtyp ohne pBACOV-sfGFP
<i>B. mojavensis</i> DSM 9205 ^T	383 ± 5,1	n. d.
<i>B. vallismortis</i> DSM 11031 ^T	239 ± 5,9	0,9 ± 0,1
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 ^T	160 ± 8,8	n. d.
<i>B. subtilis</i> RIK1285	100 ± 0,6	n. d.
<i>B. pumilus</i> DSM 27 ^T	56,1 ± 0,9	n. d. *
<i>B. pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	41,0 ± 1,5	n. d.
<i>P. polymyxa</i> DSM 356	16,7 ± 0,5	3,4 ± 0,2
<i>B. mycooides</i> DSM 2048 ^T	14,9 ± 0,1	3,1 ± 0,0
<i>B. sonorensis</i> DSM 13779 ^T	n. d.	1,1 ± 0,1

Bevor Versuche zur Übertragung von pBACOV-sfGFP in die Milchsäureproduzenten des Stammgebers ATB durchgeführt wurden, wurde die Kan-Sensitivität von vier dieser Stämme untersucht. *L. lactis* A38 und A55 sowie *L. delbrueckii* A159 und A160 wurden für drei Tage in MRS-Medium mit verschiedenen Kan-Konzentrationen (*L. lactis*: 0 µg/ml – 600 µg/ml; *L. delbrueckii*: 0 µg/ml – 200 µg/ml) bei 30 °C (*L. lactis*) bzw. 37 °C (*L. delbrueckii*) inkubiert. Bei allen Stämmen wurde eine stärkere Kan-Resistenz festgestellt, als aus den Informationen von ATB hervorging (Tabelle 30): *L. lactis* A38 wuchs selbst bei 600 µg/ml Kan, während *L. lactis* A55 ab 300 µg/ml Kan inhibiert wurde. Bei *L. delbrueckii* A159 und A160 war auch bei 200 µg/ml Kan noch Wachstum feststellbar, weswegen für diese beiden Stämme und für *L. lactis* A55 eine Kan-Konzentration von 300 µg/ml im Selektionsagar festgelegt wurde. *L. lactis* A38 wurde von den weiteren Versuchen ausgeschlossen. Bei *B. coagulans* A59 und A203 erfolgte die Selektion mit 50 µg/ml Kan.

Die Übertragung von pBACOV-*sfGFP* in *B. coagulans* A203 erfolgte per triparentaler Konjugation nach dem Standardprotokoll (siehe Material & Methoden). Anstatt LB_{Kan50,Pol40} wurde jedoch MRS_{Kan50} als Selektionsagar verwendet. Von den 1226 Kolonien auf den Selektionsplatten wurden zwölf Klone per analytischer PCR auf die Anwesenheit des Plasmids getestet. In sechs der ausgewählten Kolonien konnte das Plasmid erfolgreich nachgewiesen werden.

Bei der triparentalen Konjugation zur Übertragung von pBACOV-*sfGFP* in *B. coagulans* A59, *L. lactis* A55 sowie *L. delbrueckii* A159 und A160 wurden die Kreuzungsfilter mit den Konjugationsgemischen nicht auf LB-Agar sondern auf MRS-Agar ausgebracht, um ideale Bedingungen für die Milchsäurebildner zu schaffen. Die Inkubation der Konjugationsplatten erfolgte bei 37 °C (*B. coagulans*, *L. delbrueckii*) bzw. 30 °C (*L. lactis*). Obwohl das Wachstum von *E. coli* durch MRS-Agar nicht unterstützt wird, war der Plasmidtransfer auch bei diesen vier Stämmen erfolgreich. In allen Fällen wurden auf den Selektionsplatten mehrere hundert bis tausend Kolonien bis hin zu teilweise konfluentem Wachstum festgestellt. Es wurden wiederum jeweils elf bis zwölf Klone ausgewählt, die per analytischer PCR auf das Vorhandensein von pBACOV-*sfGFP* getestet wurden. Bei allen Stämmen konnten positive Klone nachgewiesen werden (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Koloniezahlen nach Übertragung von pBACOV-*sfGFP* in milchsäureproduzierende Stämme des ATB sowie Nachweis des Plasmids in ausgewählten Kolonien mittels analytischer PCR.

ART	ERHALTENE KOLONIEN	ANALYTISCHE PCR	
		getestete Klone	positive Klone
<i>B. coagulans</i> A59	teilweise konfluentes Wachstum	11	2
<i>B. coagulans</i> A203	1226	12	6
<i>L. lactis</i> A55	mehrere tausend Kolonien, konfluentes Wachstum	12	3
<i>L. delbrueckii</i> A159	mehrere tausend Kolonien, konfluentes Wachstum	12	7
<i>L. delbrueckii</i> A160	mehrere hundert Kolonien, konfluentes Wachstum	12	8

Bei den *B. coagulans*- und *L. delbrueckii*-Stämmen handelt es sich um thermophile Organismen mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 52 °C (siehe Tabelle 30). Um zu überprüfen, ob die Replikation von pBACOV-*sfGFP* auch bei erhöhten Temperaturen

funktioniert, wurde *B. coagulans* A203 pBACOV-*sfGFP* in MRS_{Kan50} bei 37 °C, 45 °C, 50 °C und 60 °C im Dreifachansatz inkubiert. Nach drei Tagen war in allen Röhren deutliches Wachstum feststellbar. Da Wachstum von *B. coagulans* A203 in Gegenwart von Kan nur mit vorhandener Kan-Resistenzkassette möglich ist, ist dies ein starker Hinweis auf eine erfolgreiche Replikation von pBACOV-*sfGFP*.

3.2 Paenibacillus polymyxa DSM 292 als neuer Wirt für die sekretorische Produktion heterologer Glycosidhydrolasen

pBACOV ist ein effektives Werkzeug zur genetischen Manipulation verschiedener Bazillen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde pBACOV verwendet, um mit Paenibacillus polymyxa DSM 292 einen neuen Wirt zur sekretorischen Produktion heterologer Glycosidhydrolasen zu etablieren. Dabei wurden neben der Detektion des Zielproteins im Überstand als Machbarkeitsnachweis verschiedene Versuche zur Optimierung der Produktionsleistung durchgeführt. Diese konnte durch die Auswahl geeigneter Signalpeptide, die Medienoptimierung und die Anwendung neu identifizierter Promotoren gesteigert werden.

3.2.1 Auswahl eines Kandidaten für die Entwicklung als neuer Produktionswirt

Für die Auswahl eines neuen Produktionswirts wurden neben der Anwendbarkeit von pBACOV folgende Kriterien herangezogen:

- (i) Ein schnelles Wachstum in Standard-Vollmedien, um eine leichte Handhabung und eine hohe Produktivität zu gewährleisten.
- (ii) Eine hohe Gesamtproteinkonzentration des Kulturüberstandes, was auf ein effektives Sekretionssystem schließen lässt.
- (iii) Die nachweisbare Sekretion endogener Glycosidhydrolasen, insbesondere Xyloglucanasen (XG) oder Endoglucanasen mit Aktivität auf Gersten- β -Glucan (BBG), was darauf hindeuten kann, dass auch die strukturell verwandten Zielenzyme effizient sekretiert werden können.
- (iv) Eine niedrige Sekretion von Proteasen, um die Stabilität der heterologen Zielenzyme sicherzustellen.
- (v) Eine geringe Aktivität auf Carboxymethylcellulose (CMC) durch sekretierte Wirtsenzyme, um den aktivitätsbasierten Nachweis der Zielenzyme zu erleichtern.

Die Arten, bei welchen die *sfGFP*-Expression nach Aufnahme von pBACOV-*sfGFP* erfolgreich war, wurden hinsichtlich dieser Eigenschaften untersucht. Bei *P. polymyxa* wurde nicht nur der für die Transkonjugationsversuche verwendete Stamm DSM 356 verwendet, sondern auch die anderen drei verfügbaren Stämme DSM 292, DSM 365 und DSM 36^T. Zur Untersuchung der Hydrolasesekretion wurden die Stämme auf entsprechenden Indikatorplatten kultiviert. Zum Nachweis extrazellulärer Proteaseaktivität wurde Magermilchagar verwendet, zur Detektion der Aktivität auf Glycosidhydrolasen kam NB-Agar mit 0,1 % CMC, BBG oder XG zum Einsatz. Die Bewertung der jeweiligen Hydrolaseaktivität erfolgte qualitativ anhand der Hofbildung. Das Wachstum in LB-Medium, als Beispiel für ein gängiges Vollmedium, wurde anhand der Zelldichte (OD₆₀₀) nach Inkubation im Schüttelinkubator über Nacht bewertet. Dieselben Kulturen wurden auch verwendet, um die Sekretionsleistung der Stämme abzuschätzen. Dazu wurden die Kulturen für 5 min bei 16 200 g abzentrifugiert und die Proteinkonzentration des Kulturüberstands mittels Bradford-Test gemessen. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Untersuchung verschiedener extrazellulärer Hydrolaseaktivitäten, des Wachstums in LB-Medium und der Proteinsekretionsleistung ausgewählter Stämme. Nach Wachstum auf Magermilchagar-Platten (Milch) oder NB-Agar mit 0,1 % CMC, XG oder BBG wurde anhand der Hofbildung die jeweilige Hydrolaseaktivität abgeschätzt (-: keine Aktivität, +: schwache bis mittlere Aktivität, ++: starke Aktivität). Das Wachstum in LB-Medium (OD₆₀₀) und die Proteinkonzentration im Überstand (Bradford-Test) wurden nach Inkubation über Nacht ermittelt (Einfachbestimmung). n. b.: nicht bestimmt.

ART	HYDROLASEAKTIVITÄT				OD ₆₀₀	PROTEINKONZENTRATION IM ÜBERSTAND [µG/ML]
	Milch	CMC	XG	BBG		
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 ^T	+	+	+	-	6,660	129,7
<i>B. mojavensis</i> DSM 9205 ^T	++	++	-	++	n. b.	n. b.
<i>B. mycooides</i> DSM 2048 ^T	-	-	+	+	0,239	29,1
<i>B. pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	+	+	-	-	n. b.	n. b.
<i>B. pumilus</i> DSM 27 ^T	++	-	-	++	5,449	37,0
<i>B. subtilis</i> RIK1285	-	++	+	++	6,170	86,5
<i>B. vallismortis</i> DSM 1103 ^T	+	+	-	+	n. b.	n. b.
<i>P. polymyxa</i> DSM 292	-	+	++	++	1,220	93,1
<i>P. polymyxa</i> DSM 356	++	++	++	++	0,986	107,7
<i>P. polymyxa</i> DSM 365	+	+	++	++	0,344	11,2
<i>P. polymyxa</i> DSM 36 ^T	++	++	++	++	0,377	15,4

Die Ausprägung der Hydrolaseaktivitäten unterschied sich zwischen den Stämmen deutlich. *B. mycoides* DSM 2048^T und *B. pseudomycoides* DSM 12442^T wiesen beispielsweise nur schwache oder keine Höfe auf, was auf eine niedrige Sekretion der entsprechenden Hydrolasen hinweist. Dagegen zeigten beispielsweise *B. mojaviensis* DSM9205^T sowie die *P. polymyxa*-Stämme DSM 356, DSM 365 und DSM 36^T stark ausgeprägte Abbauhöfe bei den meisten Substraten. *P. polymyxa* DSM 292 zeigte ähnliche Eigenschaften wie die anderen Stämme seiner Art, mit der bemerkenswerten Ausnahme der nicht feststellbaren extrazellulären Proteaseaktivität.

Eine niedrige extrazelluläre Proteaseaktivität war ein entscheidendes Charakteristikum bei der Auswahl des neuen Produktionswirts, um die Stabilität des Zielenzym im Kulturüberstand sicherzustellen. Somit kamen von den untersuchten Stämmen *B. mycoides* DSM 2048^T, *B. subtilis* RIK1285 und *P. polymyxa* DSM 292 in die engere Auswahl. *B. mycoides* DSM 2048^T wurde wegen des geringen Wachstums in LB-Medium und der schwachen Sekretionsleistung ausgeschlossen. *B. subtilis* ist als Wirt für die sekretorische Enzymproduktion bereits bestens etabliert, wohingegen noch keine Berichte über die Verwendung von *P. polymyxa* DSM 292 als Expressionsstamm vorliegen. Die geringere CMC-Case-Aktivität im Vergleich zu *B. subtilis* RIK1285 war ein weiteres Argument für *P. polymyxa* DSM 292. Somit wurde *P. polymyxa* DSM 292 als Kandidat für die Entwicklung zu einem neuen Expressionsstamm ausgewählt.

Für erfolgreiche gentechnische Arbeiten mit *P. polymyxa* DSM 292 ist eine Genomsequenz unerlässlich. Da diese Sequenzinformation für diesen Stamm nicht vorlag, wurde in Zusammenarbeit mit der Zentraleinrichtung für *Next Generation Sequencing* des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) der TU München ein Genomsequenzierungsprojekt durchgeführt (Heinze et al., 2020). Dabei wurde mittels *Illumina MiSeq Paired End Sequencing* die Genomsequenz von *P. polymyxa* DSM 292 ermittelt (siehe Kapitel 2.6.14). Der so erstellte Entwurf des Gesamtgenoms von *P. polymyxa* DSM 292 setzte sich aus 23 *Contigs* mit einer durchschnittlich 90,4-fachen Abdeckung zusammen. Die Gesamtlänge der 23 *Contigs* betrug 6 030 236 bp mit einem G+C-Gehalt von 45,5 %. Die Vorhersage und Annotation offener Leserahmen

(ORFs) ergab 5 365 Protein- und 99 tRNA-kodierende Sequenzen. Die Sequenzdaten wurden- im *European Nucleotide Archive* (ENA) öffentlich verfügbar gemacht (Accession der Contigs 1 bis 23: OKC01000001 bis OKC01000023; Accession des Assembly: GCA_900406265).

3.2.2 Machbarkeitsnachweis: sekretorische Produktion von Cel8A

Um nachzuweisen, ob *P. polymyxa* DSM 292 für die sekretorische Produktion heterologer Enzyme geeignet ist, wurde als Zielprotein Cel8A aus *H. thermocellum* ausgewählt. In dieser Arbeit kam eine synthetisierte Version des *cel8A*-Gens mit Kodonoptimierung für *Bacillus megaterium* zum Einsatz, welche bereits am Lehrstuhl verfügbar war. Die *codon usage* dieses synthetischen Gens und der natürlichen *cel8A*-Sequenz aus *H. thermocellum* wurde mit der *codon usage* Tabelle von *P. polymyxa* verglichen. Dafür wurde das Programm GCUA (*graphical codon usage analyzer*, <http://gcu.schoedl.de>, Fuhrmann et al., 2004) verwendet. Der mittlere Unterschied der *codon usage* der Sequenz von *H. thermocellum* zur idealen *codon usage* von *P. polymyxa* betrug demnach etwa 32 %, während die synthetisierte Sequenz einen mittleren Unterschied von 22 % aufwies. Somit war für die synthetisierte Sequenz eine höhere Translationseffizienz in *P. polymyxa* zu erwarten. Um das *cel8A*-Gen in pBACOV einzufügen, wurden sowohl der Vektor als auch das mittels PCR amplifizierte Zielgen sequenziell mit *NdeI* und *XbaI* geschnitten. Die anschließende Ligierung erfolgte bei einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:5. Die Klonierungsarbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Petra Kornberger. Nachdem die erwartete Nukleotidsequenz von pBACOV-*cel8A* durch Sequenzierung bestätigt wurde, wurde das Expressionsplasmid per Konjugation in *P. polymyxa* DSM 292 übertragen.

Nachdem berichtet wurde, dass die Ausbeute an sekretiertem Zielprotein gesteigert werden kann, indem der pH-Wert des Kulturmediums dem pH-Optimum des Zielproteins angepasst wird (Küppers et al., 2014), wurde für den ersten Versuch zur Cel8A-Produktion phosphatgepuffertes Vollmedium VM (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 125 mM Natriumphosphat-Puffer, siehe Tabelle 9) bei pH 7,0 und pH 5,7 eingesetzt. Das pH-Optimum von rekombinantem Cel8A liegt bei pH 5,5 – 6,5 (Schwarz et al., 1986). Je

50 ml des jeweiligen Mediums wurden mit Vorkulturen von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-*cel8A* bzw. *P. polymyxa* DSM 292 ohne Plasmid (als Negativkontrolle) auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden aus den Schüttelkolben Proben entnommen und die CMCCase-Aktivität des Kulturüberstandes mittels DNSA ermittelt. Zudem wurden die Proben mittels Western-Blot untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

Unabhängig vom pH-Wert des Mediums war in den Kulturüberständen des Expressionsstammes mit pBACOV-*cel8A* bereits nach 4 h eine Zunahme der CMCCase-Aktivität feststellbar (Abbildung 8a, oberes Diagramm). Nach einer Inkubationszeit von 29 h erreichte die CMCCase-Aktivität der Kulturen beider pH-Werte einen Höchstwert von $32,1 \pm 2,9$ U/l (pH 5,7) bzw. $35,3 \pm 0,7$ U/l (pH 7,0). Die CMCCase-Aktivität des Kulturüberstandes der Negativkontrolle (Abbildung 8a, unteres Diagramm) bei pH 7,0 erreichte im selben Zeitraum ein Maximum von $25,8 \pm 4,1$ U/l, während die Negativkontrolle bei pH 5,7 keine signifikante CMCCase-Aktivität aufwies ($3,1 \pm 1,5$ U/l). Somit war die Menge an produziertem Cel8A, gemessen als Aktivität nach Abzug des Hintergrunds durch endogene Cellulasen, bei pH 5,7 mit 29,0 U/l größer als bei pH 7,0 (9,5 U/l). Besonders wichtig für die weiteren Versuche war zudem die Erkenntnis, dass die Hintergrundaktivität auf CMC durch endogene Wirtsenzyme bei Verwendung eines geeigneten Kulturmediums auf nahezu Null gesenkt werden kann. Dies ermöglichte den einfachen, aktivitätsbasierten Nachweis des Zielenzyms im Kulturüberstand.

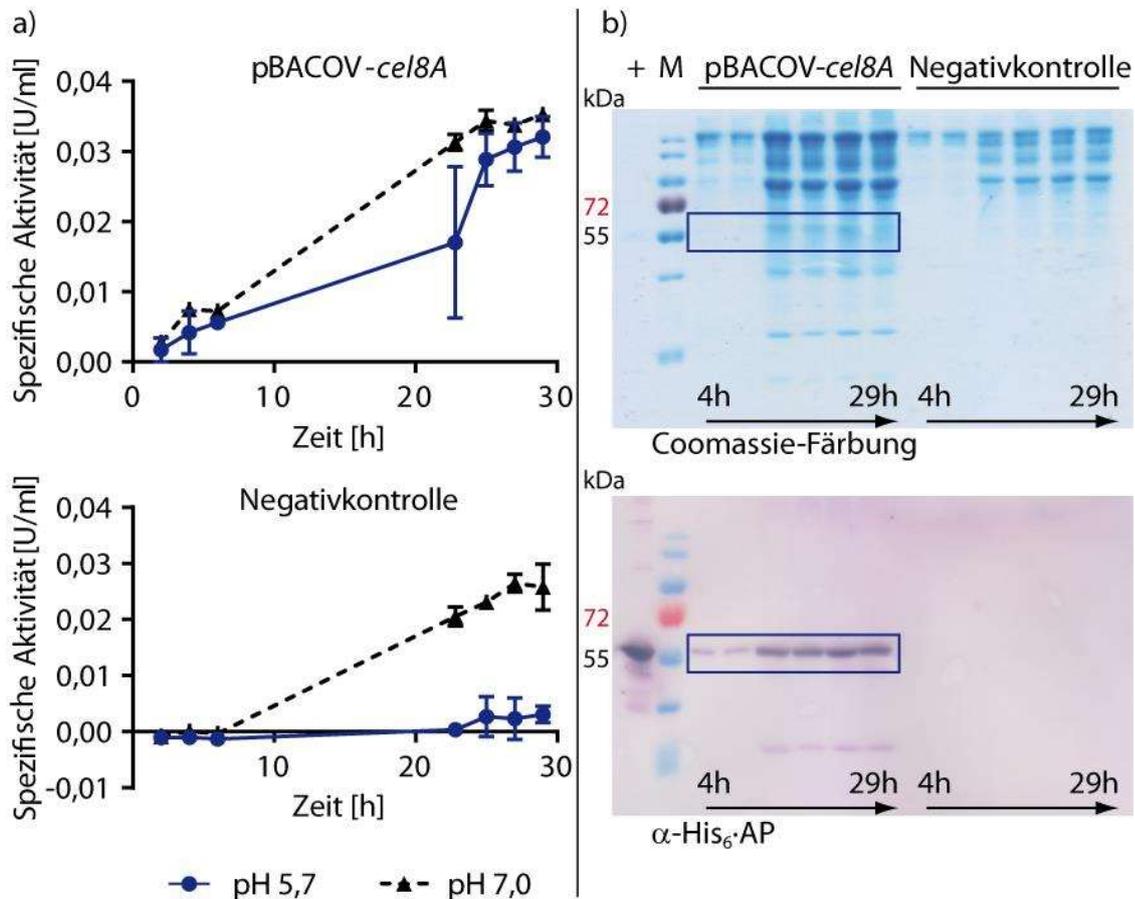


Abbildung 8: Zeitverlauf der sekretorischen *cel8A*-Expression in *P. polymyxa* DSM 292 in Abhängigkeit vom pH-Wert des Kulturmediums. a) Die CMCase-Aktivität von 37,5 μ l Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-*cel8A* oder ohne Plasmid (Negativkontrolle) in VM-Medium (pH 5,7 oder 7,0) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels der DNSA-Methode gemessen (Inkubation für 60 min bei 60 °C und NaAc-puffer pH 5,0). Blaue Linie: spezifische Aktivität der Kultur in VM-Medium pH 5,7; schwarze, gestrichelte Linie: spezifische Aktivität der Kultur in VM-Medium pH 7,0. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von Dreifachmessungen. b) Die Proben der Kulturen bei pH 5,7 wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mittels α -His₆-AP-Antikörper untersucht (10 % PA-Gele). Pro Spur wurden die TCA-gefällten Proteine aus 750 μ l Kulturüberstand aufgetragen. Das Zielprotein Cel8A auf Höhe der Referenz ist durch Kästchen gekennzeichnet. +: 2 μ g Cel8A, Referenzprotein gereinigt aus *E. coli*. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Die Überstände der Kulturen mit pH 5,7 wurden zudem mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Dazu wurden pro Spur die mit TCA gefällten Proteine aus 750 μ l Kulturüberstand aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung (SDS-PAGE) bzw. eines α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugats sichtbar gemacht (Abbildung 8b). Bei den Proben des Expressionsstammes mit pBACOV-*cel8A* war im Western-Blot bereits nach 4 h eine

schwache Bande auf Höhe des Referenzproteins Cel8A erkennbar. Die Intensität dieser Bande war bei den Zeitpunkten von 23 h bis 29 h am höchsten. Zudem war ab 23 h eine kleinere Bande mit niedrigerer Intensität vorhanden. Da der verwendete Antikörper den C-terminalen His₆-tag nachweist, handelte es sich bei dieser zusätzlichen Bande vermutlich um ein proteolytisch gebildetes, C-terminales Fragment von Cel8A. Auf dem Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gel war zusätzlich zu einigen Wirtsproteinen auch die entsprechenden Cel8A-Bande schwach zu sehen. Diese Banden fehlten sowohl im Western-Blot als auch auf dem SDS-PA-Gel bei den Proben der Negativkontrolle. Somit konnte am Beispiel von Cel8A erfolgreich gezeigt werden, dass *P. polymyxa* DSM 292 als neuer Expressionsstamm für die Produktion heterologer Enzyme geeignet ist. Bemerkenswert ist dabei besonders die Tatsache, dass das Zielprotein Cel8A in voller Länge nachweisbar war und somit wohl größtenteils stabil im Überstand vorlag.

Zur weiteren Untersuchung der Eigenschaften von *P. polymyxa* DSM 292 als Produktionsorganismus wurden mit Cel9D, Cel9R und Xgh74A drei weitere thermophile Zielproteine aus *H. thermocellum* ausgewählt. Die Zielgene *cel9D*, *cel9R* und *xgh74A* wurden mit Kodonoptimierung für *B. subtilis* von Eurofins Genomics GmbH synthetisiert. Die gelieferten Gene wurden analog zu *cel8A* in pBACOV umkloniert und die jeweilige Nukleotidsequenz durch Sequenzierung bestätigt. Diese Klonierungsarbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Petra Kornberger (Klonierung von *cel9D*) sowie im Rahmen der Bachelorarbeiten von Lisa Bock (Klonierung von *cel9R*) und Christian Grätz (Klonierung von *xgh74A*) geplant und durchgeführt.

3.2.3 Identifikation geeigneter Signalpeptide

Sekretorische Signalpeptide (SP) spielen eine Schlüsselrolle bei der Proteinsekretion. Durch die Verbindung mit einem geeigneten SP lässt sich die Ausbeute eines sekretierten Zielproteins erheblich steigern (Harwood & Cranenburgh, 2008; Li et al., 2004; Pohl & Harwood, 2010; Westers et al., 2004). Obwohl die Funktionsweise von SPs genau untersucht ist, ist die Vorhersage eines optimalen SP für ein gegebenes, heterologes Zielprotein bislang nicht möglich, weshalb für jedes neue Zielprotein in jedem Wirtstamm geeignete SPs experimentell identifiziert werden müssen (Brockmeier et al.,

2006; Degering et al., 2010; Song et al., 2015). Deshalb sollten als erster Schritt zur Produktionssteigerung geeignete SPs für die Zielenzyme Cel8A, Cel9D, Cel9R und Xgh74A gefunden werden.

Um im Hochdurchsatzverfahren verschiedene SPs für die vier Zielenzyme zu untersuchen, wurde das *B. subtilis* Secretory Protein Expression System Kit (TaKaRa Bio) verwendet. Es enthält eine SP DNA Mischung mit den kodierenden Sequenzen für alle 173 SPs aus *B. subtilis*. Um SP-Bibliotheken für Cel8A, Cel9D, Cel9R und Xgh74A zu erstellen, wurde das ursprünglich in pBACOV enthaltene SP_{aprE} durch sequenziellen Restriktionsverdau mit *MluI* und *EagI* entfernt. Anschließend wurde mittels des In-Fusion HD Cloning Systems (TaKaRa Bio) nach Herstellerangaben die SP DNA Mischung eingefügt, wobei immer jeweils eine SP-kodierende Sequenz in ein Plasmidmolekül eingefügt wird. Nach der Transformation kompetenter *E. coli* StellarTM-Zellen mit dem Produkt der In-Fusion-Reaktion sollte somit jeder Klon eine einzige SP-kodierende Sequenz enthalten.

Die Berechnung der benötigten Anzahl an Kolonien, um alle 173 SPs der Bibliothek vollständig abzudecken, erfolgte mittels der Formel für das sogenannte Sammelbilderproblem (siehe Anhang A2). Dies ergab, dass für eine Bibliothek mit 173 SP ab 992 Kolonien eine vollständige Abdeckung erwartet werden kann. Um diese Koloniezahl zu erreichen, war es entscheidend, die Transformation von *E. coli* StellarTM nicht nach dem allgemeinen Transformationsprotokoll für chemisch kompetente *E. coli* (Kapitel 2.6.2), sondern genau nach den Herstellerangaben zum *B. subtilis* Secretory Protein Expression System Kit (TaKaRa Bio) durchzuführen (siehe Kapitel 2.6.8). Die im weiteren Verlauf beschriebenen Ergebnisse zur Erzeugung und Durchmusterung von SP-Bibliotheken entstanden teilweise im Rahmen der Bachelorarbeiten von Lisa Bock und Christian Grätz.

Auch beim Übertragen einer vollständig abgedeckten SP-Bibliothek von *E. coli* auf den Gram-positiven Expressionsstamm (z. B. *B. subtilis* oder *P. polymyxa*) ist auf eine ausreichend hohe Koloniezahl zu achten. Bei Verwendung des Plasmids pBE-S, für welches das Kit von TaKaRa Bio entwickelt wurde, müssen dazu erst alle *E. coli*-

Kolonien geerntet und die Plasmid-DNA isoliert werden. Da die Transformationseffizienz von *B. subtilis* RIK1285 laut Angaben von TaKaRa Bio $1,2 \times 10^2$ Kolonien pro μg DNA beträgt, müssen für eine vollständig abgedeckte Bibliothek in *B. subtilis* RIK1285 mehr als $8 \mu\text{g}$ gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt werden, sodass die Anzahl an Versuchsansätzen limitiert ist bzw. erheblicher Aufwand betrieben werden muss, um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren. Wird hingegen die SP-Bibliothek in pBACOV kloniert, können die erhaltenen *E. coli* Stellar™-Kolonien direkt vereinigt werden und zum Animpfen der Donorhauptkultur für die triparentale Konjugation dienen. In Abweichung von dem in Kapitel 2.6.15 beschriebenen Protokoll entfällt in diesem Fall der Konjugationsansatz mit den stationären Vorkulturen. Auf diese Weise wurden die erzeugten SP-Bibliotheken der vier Zielgene *cel8A*, *cel9D*, *cel9R* und *xgh74A* zur Durchmusterung in *P. polymyxa* DSM 292 übertragen. Hierbei wurden hohe Koloniezahlen erreicht. Für *cel8A* und *cel9D* wurden zwei SP-Bibliotheken erstellt. Die erhaltenen Koloniezahlen der SP-Bibliotheken, sowohl in *E. coli* Stellar™ als auch in *P. polymyxa* DSM 292, sind in Tabelle 35 dargestellt.

Der kritische Schritt bei der erfolgreichen Konstruktion vollständig abdeckender SP-Bibliotheken war die Klonierung in *E. coli*. Um ausreichende Koloniezahlen zu erhalten, war die strikte Einhaltung einer Reihe von Bedingungen wichtig (siehe Kapitel 2.6.8).

Tabelle 35: Koloniezahlen bei der Erzeugung von SP-Bibliotheken für alle vier Zielgene in *E. coli* Stellar™ und nach der Übertragung in *P. polymyxa* DSM 292 mittels triparentaler Konjugation. Für *cel8A* und *cel9D* wurden zwei SP-Bibliotheken erstellt (Bib1 und Bib2)

ZIELGEN	KOLONIEZAHL	
	<i>E. coli</i> Stellar™	<i>P. polymyxa</i> DSM 292
<i>cel8A</i> Bib1	208	1 433
<i>cel8A</i> Bib2	1 179	2 847
<i>cel9D</i> Bib1	> 5 000	1 951
<i>cel9D</i> Bib2	> 3 254	1 111
<i>cel9R</i>	1 556	935
<i>xgh74A</i>	1 522	3 320

Die SP-Bibliotheken von *cel9D* und *xgh74A* konnten als vollständig abgedeckt bezeichnet werden, da die Koloniezahlen sowohl in *E. coli* Stellar™ als auch in *P.*

polymyxa DSM 292 deutlich über der erforderlichen Anzahl von 992 lag. Bei der Klonierung der SP-Bibliotheken für *cel8A* und *cel9R* wurden zunächst nicht genügend *E. coli*-Kolonien erhalten. Bei *cel8A* Bib1 wurde für die ersten Versuche mit der unvollständigen Bibliothek weitergearbeitet, um das Durchmusterungsverfahren zu etablieren und zu optimieren. Im weiteren Verlauf wurde dann für *cel8A* eine weitere SP-Bibliothek (Bib2) unter geänderten Bedingungen erstellt und durchmustert (siehe unten). Für *cel9R* wurden drei Klonierungsansätze durchgeführt, die in Summe eine ausreichende Koloniezahl lieferten (Koloniezahlen: 421, 651, 484). Hier konnte zwar in *E. coli* StellarTM eine ausreichende Koloniezahl erreicht werden, die erhaltene Koloniezahl bei dem Transfer in *P. polymyxa* DSM 292 lag mit 935 Kolonien jedoch knapp unter dem Grenzwert für eine erwartete vollständige Abdeckung.

In Anhang A2 ist die Berechnung dargestellt, die angibt, wie viele verschiedene SP in den nicht voll abgedeckten SP-Bibliotheken von *cel8A* Bib1 und *cel9R* erwartet werden können. Es kann davon ausgegangen werden, dass die SP-Bibliothek von *cel8A* mit 208 Kolonien etwa 121 verschiedene SPs enthielt. Analog ergibt sich für die *cel9R*-SP-Bibliothek mit $x = 935$ ein Erwartungswert von rund 172, was einer annähernd vollständigen statistischen Abdeckung entspricht.

Zur Durchmusterung der Bibliotheken musste ein geeignetes Verfahren entwickelt werden. Um einen hohen Durchsatz zu erzielen, sollten die einzelnen Klone in sogenannten *96-Deep-Well* Platten mit 900 µl Kulturmedium pro Kavität kultiviert werden, um im Anschluss die Enzymaktivität im Überstand zu messen. Um die Qualität der Hochdurchsatzmessungen abzuschätzen, wurde der Z' -Wert eingeführt (Zhang et al., 1999). Dieser statistische Parameter ermöglicht eine einfache Abschätzung der Qualität einer Untersuchungsmethode. Der Z' -Wert wird aus den Mittelwerten μ und Standardabweichungen σ der Negativ- und Positivkontrollen (c^- und c^+) wie folgt berechnet:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c^+} + 3\sigma_{c^-})}{|\mu_{c^+} - \mu_{c^-}|}$$

Z' kann zwischen -1 (=Messwert entspricht dem unteren Detektionslimit des Messgeräts) und 1 liegen (eine ideale Untersuchungsmethode). Werte zwischen 0,5 und 1 deuten auf eine exzellente Methode hin, bei einem Wert von Null kann lediglich eine „Ja/Nein“-Aussage getroffen werden und bei negativen Werten ist eine sinnvolle Untersuchung nicht möglich (Zhang et al., 1999).

Um einen möglichst hohen Z'-Wert zu erreichen, wurden vier verschiedene Medien im 96-Deep-Well-Block getestet: VM pH 5,7, VM pH 5,7 mit 10 mM CaCl₂, LB mit 15 g/l Glycerin (LB-G) sowie LB mit 0,5 M Sorbit (LB-S). Je acht Kavitäten eines 96-Deep-Well-Blocks wurden mit diesen Medien gefüllt. Je Medium wurden drei Kavitäten 1:10 mit Vorkulturen von *P. polymyxa* DSM 292 mit pBACOV-*cel8A* oder ohne Plasmid angeimpft. Nach Inkubation bei 30 °C und 375 rpm für 22,5 h wurden die Blöcke abzentrifugiert und die CMC_{Case}-Aktivität des Überstandes mittels DNSA gemessen sowie die Z'-Werte für jedes Medium berechnet (Tabelle 36). Zwei Medien, LB-S und VM pH 5,7 mit 10 mM CaCl₂, lieferten Z'-Werte nahe 0,5 und erwiesen sich somit als gut geeignet. Da der Wert von LB-S mit 0,48 am höchsten war, wurde dieses Medium für die Durchmusterung der SP-Bibliotheken ausgewählt.

Tabelle 36: Berechnung des Z'-Werts für die *cel8A*-Expression mit verschiedenen Medien. *P. polymyxa* DSM 292 mit pBACOV-*cel8A* oder ohne Plasmid (NK) wurde im Dreifachansatz im 96-Deep-Well-Block in den angegebenen Medien inkubiert (30 °C, 375 rpm, 22,5 h). Im Anschluss wurde die CMC_{Case}-Aktivität mit der DNSA-Methode gemessen (Inkubation für 60 min bei 60 °C, NaAc-Puffer pH 5,0). Aus den jeweiligen Mittelwerten und Standardabweichungen wurde der Z'-Wert für die jeweilige Versuchsbedingung errechnet.

MEDIUM	STAMM	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT [U/L]		Z'-WERT
		Mittelwert	Standardabweichung	
VM pH 5,7	pBACOV- <i>cel8A</i>	53,49	6,14	0,37
	NK	10,96	2,74	
VM pH 5,7 + 10 mM CaCl ₂	pBACOV- <i>cel8A</i>	40,87	5,98	0,46
	NK	5,28	0,41	
LB-S	pBACOV- <i>cel8A</i>	75,57	6,14	0,48
	NK	18,84	3,64	
LB-G	pBACOV- <i>cel8A</i>	53,56	12,38	-0,02
	NK	10,25	2,41	

Die Durchmusterung der unvollständig abgedeckten *cel8A*-SP-Bibliothek Bib1 diente zum einen der Identifikation passender SPs und zum anderen der Etablierung der Durchmusterungsmethode. Dazu wurden fünf mit LB-S gefüllte 96-Deep-Well-Blöcke

mit insgesamt 480 Kolonien der in *P. polymyxa* DSM 292 übertragenen SP-Bibliothek angeimpft. Ein weiterer Block wurde je zur Hälfte mit Kolonien der Referenz mit dem ursprünglich in pBACOV vorhandenen SP_{aprE} (*P. polymyxa* pBACOV-*cel8A*) und der Negativkontrolle (*P. polymyxa* DSM 292) angeimpft. Die Blöcke wurden für zwei Tage bei 30 °C, 375 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Blöcke abzentrifugiert (10 min, 2 177 g) und die CMC_{ase}-Aktivität des Überstandes gemessen. Zur graphischen Auswertung wurden die einzelnen Klone gemäß ihrer spezifischen Aktivität in Schritten von 0,01 U/ml gruppiert. So wurden beispielsweise alle Klone mit einer Aktivität zwischen 0,08 U/ml und 0,09 U/ml in einer Gruppe zusammengefasst. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Gruppen ist als Histogramm in Abbildung 9a dargestellt.

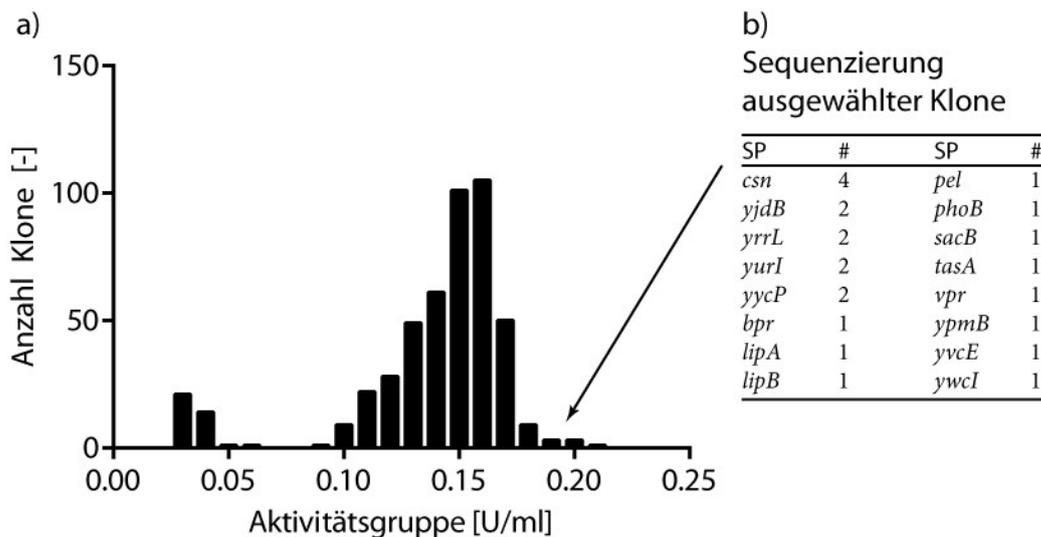


Abbildung 9: a) Häufigkeitsverteilung der Aktivitäten bei der Durchmusterung der ersten SP-Bibliothek für *cel8A*. Es wurden 480 Kolonien von *P. polymyxa* DSM 292 aus der SP-Bibliothek ausgewählt und in 96-Deep-Well-Blöcken mit LB-S Medium inkubiert (30 °C, 375 rpm, 2 d). Die einzelnen Klone wurden basierend auf der CMC_{ase}-Aktivität der Überstände gruppiert, z. B. enthält die Gruppe mit Aktivitäten zwischen 0,15 U/ml und 0,16 U/ml 101 verschiedene Klone. b) Klone mit hoher Aktivität wurden ausgewählt und durch Sequenzierung das jeweilige SP identifiziert. Die einzelnen SP traten in einer unterschiedlichen Anzahl (#) von Klonen auf.

Es wurden 24 Klone mit hoher Aktivität ausgewählt, deren Plasmide isoliert und zur Bestimmung des jeweiligen SP sequenziert. Zur Identifikation der signalpeptid-

kodierenden Sequenz in den Sequenzierergebnissen wurden alle 173 SP-Sequenzen als in Clone Manager 9 als eine Primerliste zusammengefügt und dann mittels der Funktion „*find primers that bind*“ von Clone Manager 9 passende Sequenzen identifiziert. In Einzelfällen lieferte diese Methode keinen Treffer, woraufhin die Qualität der jeweiligen Sequenzierungen geprüft wurde, um dann gegebenenfalls mittels Blast weiter zu versuchen, das SP zu identifizieren. Dabei wurden 16 verschiedene SP identifiziert (Abbildung 9b). SP_{csn} wurde viermal gefunden und trat damit am häufigsten auf. Die anderen 15 SP traten jeweils ein- oder zweimal auf. Je SP wurde ein Klon für weitere Tests im Kölbchenmaßstab ausgewählt. Dazu wurden je drei Erlenmeyerkölbchen mit 20 ml LB-S mit den ausgewählten Klonen angeimpft und für 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Als Referenzen dienten *P. polymyxa* DSM 292 ohne Plasmid, mit pBACOV und mit pBACOV-*cel8A*. Anschließend wurden die OD₆₀₀ der Kulturen und die CMC-Case-Aktivität der Überstände per DNSA gemessen. Die gemessenen Aktivitäten sind in Abbildung 10 dargestellt. Gegenüber dem Referenzstamm mit pBACOV-*cel8A* (SP_{aprE}) zeigten 13 Klone eine erhöhte Aktivität. Die besten Klone waren dabei 4B11 (SP_{lipB}), 4C10 (SP_{csn}) und 1F5 (SP_{lipA}), mit einer Aktivitätssteigerung gegenüber SP_{aprE} von jeweils knapp 30 %. Zusätzlich zu den SP aus der Bibliothek wurde eine Variante mit dem nativen SP_{cel8A} von *cel8A* aus *H. thermocellum* durch *annealed oligo cloning* erstellt (siehe Bachelorarbeit Christian Grätz). Ein Aktivitätstest im 20 ml-Maßstab zeigte keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zwischen SP_{cel8A} und SP_{lipB}, SP_{csn} und SP_{lipA}.

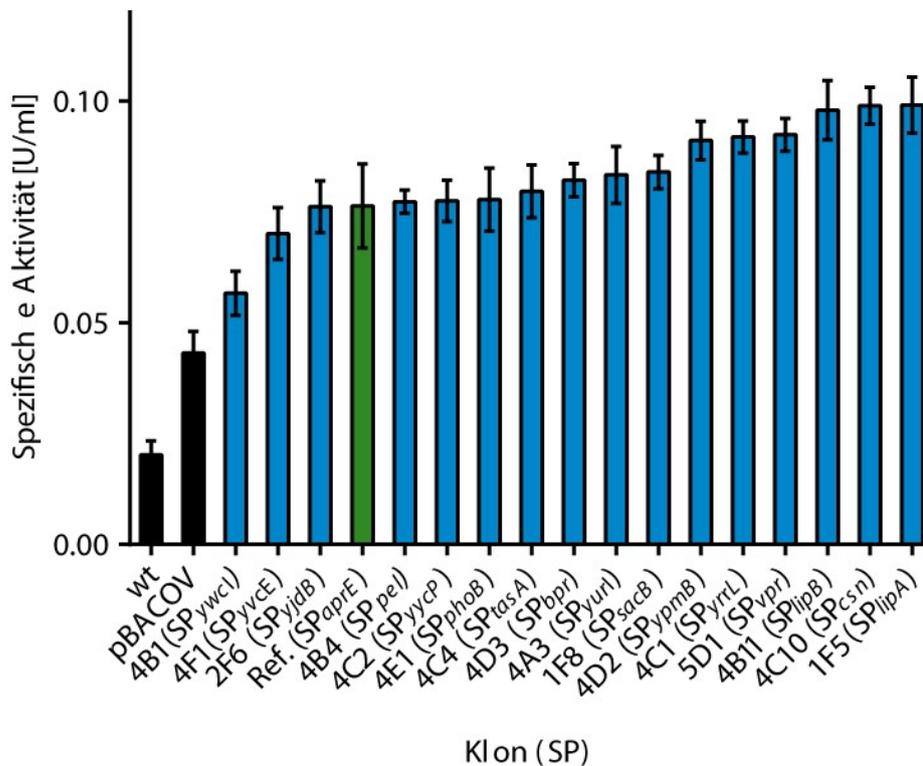


Abbildung 10: CMCase-Aktivitäten der Überstände der 16 ausgewählten Klone der *cel8A*-SP-Bibliothek (blaue Balken). Die Zellen wurden in je 3 × 20 ml LB-S für 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Messung der CMCase-Aktivität erfolgte mit der DNSA-Methode bei 60 °C, NaAc-Puffer pH 5,0 für 1 h. Schwarze Balken: Negativkontrollen (*P. polymyxa* DSM 292 ohne Plasmid (wt) oder mit pBACOV); grüner Balken *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-*cel8A* (Referenzstamm mit SP_{aprE}). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

Die Überstände der *P. polymyxa* DSM 292 Kulturen mit pBACOV-*cel8A* mit den Signalpeptiden SP_{cel8A}, SP_{aprE}, SP_{lipB}, SP_{csn} und SP_{lipA} wurden zusätzlich mittels Western-Blot untersucht (α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat). Dabei war bei allen fünf SP eine Bande bei etwa 55 kDa, also etwas oberhalb der erwarteten Höhe des Volllängenproteins Cel8A-His₆ (51 kDa) erkennbar (Abbildung 11). Im Vergleich zum Referenzprotein, welches in *E. coli* produziert wurde, weisen diese Banden ein höheres apparentes Molekulargewicht auf. Ein Grund kann proteolytischer Abbau des Referenzproteins sein. Hierfür spricht insbesondere, dass die Bande des Referenzproteins in anderen SDS-PA-Gelen bzw. Westernblots ebenfalls auf Höhe der 55 kDa-Markerbande lief (siehe Abbildung 8, Abbildung 18 und Abbildung 29). Eine weitere Möglichkeit sind

posttranslationale Modifikationen des Zielenzym, wie z. B. Glykosylierung. Desweiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass das SP vom Zielenzym im Überstand der *P. polymyxa*-Kulturen nicht abgespalten wurde. Beispielsweise beträgt das Molekulargewicht von SP_{aprE}-Cel8A-His₆ 54 kDa. Dies würde bedeuten, dass bei der Sekretion des Zielenzym nicht alle Schritte des Sec-Mechanismus vollständig durchlaufen wurden oder das Zielenzym durch Zelllyse freigesetzt wurde.

Die Intensität der Zielenzymbande der Kultur mit SP_{aprE} war im Vergleich zu den anderen vier SP etwas schwächer, während die Intensität der Bande der Kultur mit SP_{lipB} geringfügig stärker als bei den anderen Proben war. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Aktivitätstests und zeigt, dass in allen Fällen das Zielprotein stabil und in voller Länge im Kulturüberstand vorlag (Abbildung 11).

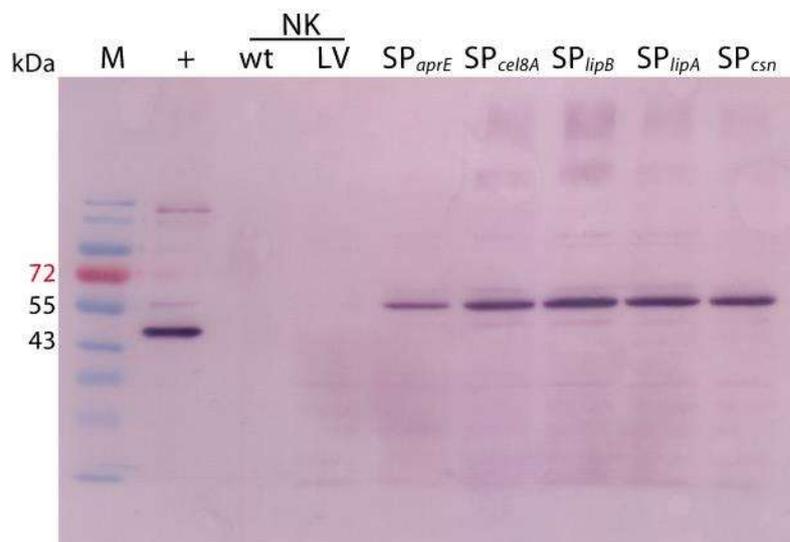


Abbildung 11: Westernblot von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-*cel8A* mit verschiedenen SP. Verwendeter Antikörper: α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat. Pro Spur wurden die mit TCA gefällten Proteine aus jeweils 500 μ l Kulturüberstand aufgetragen. Negativkontrollen (NK): Überstände von *P. polymyxa* DSM 292 ohne Plasmid (Wildtyp, wt) bzw. mit dem Leervektor pBACOV (LV). Positivkontrolle: 0,5 μ g gereinigtes Cel8A, produziert in *E. coli*.

Somit konnten durch die Durchmusterung der ersten SP-Bibliothek vier geeignete SP für die Expression von *cel8A* identifiziert werden. Aufgrund der hohen Aktivität des Überstandes und der intensiven Bande im Westernblot wurde der Klon 4B11 (SP_{lipB}) als bester Klon für die sekretorische Produktion von Cel8A ausgewählt. Dieser Klon war die

Grundlage für die weiteren Versuche zur Optimierung der Cel8A-Produktion.

Analog zur Durchmusterung der *cel8A*-SP-Bibliothek Bib1 wurde auch die erste SP-Bibliothek Bib1 für *cel9D* untersucht. Hierbei wurden 420 Klone für 48 h bei 30 °C und 375 rpm in mit LB-S gefüllten *96-Deep-Well*-Blöcken inkubiert und die OD₅₉₅ der einzelnen Kulturen gemessen. Im Anschluss wurde die CMC_{Case}-Aktivität der Kulturen mittels DNSA am „Temperaturoptimum“ von Cel9D gemessen [60 °C, 60 min, MOPS-Puffer pH 6,5, (Peng et al., 2011)]. Für die Auswahl der besten Klone der *cel9D*-SP-Bibliothek wurden verschiedene Kriterien angelegt: Zwölf Klone wurden aufgrund ihrer hohen spezifischen Aktivität [U/ml] ausgewählt, zehn weitere wegen einer hohen spezifischen Aktivität pro Zellzahl [U/(ml × OD₅₉₅)] und sieben weitere Klone wiesen sowohl eine hohe spezifische Aktivität als auch eine spezifische Aktivität pro Zellzahl auf. Fünf weitere Klone wurden zufällig ausgewählt. Die Plasmid-DNA dieser 34 Klone wurde isoliert und zur Identifikation der SP sequenziert (Tabelle 37). Besonders häufig trat SP_{ywjE} auf, es wurde in 27 Klonen gefunden. Darüber hinaus wurden mit SP_{glpQ}, SP_{yknX} und SP_{yolC} drei weitere SP identifiziert. Zudem verfügte Klon 3B10 nicht über eine vollständige SP-Sequenz; zwischen den beiden Restriktionsschnittstellen für *MluI* und *EagI* befanden sich lediglich 31 bp. Diese kodierten für die Aminosäuresequenz MKLFNRIVIS, wobei die ersten sieben Aminosäuren dem Anfang von SP_{ydbK} entsprechen. Laut TaKaRa Bio können in seltenen Fällen solche Nebenprodukte der PCR-basierten Herstellung der SP DNA Mischung auftreten. In der Regel handelt es sich dabei jedoch um Primer-Dimere.

Tabelle 37: Ergebnis der Sequenzierung ausgewählter Klone der ersten SP-Bibliothek für *cel9D*. Das identifizierte Primer-Dimer kodiert für die ersten sieben Aminosäuren von SP_{ydbK}.

SP	ANZAHL
ywjE	27
glpQ	4
yknX	1
yolC	1
Primer-Dimer	1

Zur weiteren Untersuchung wurden zwei Klone mit SP_{ywjE} und je ein Klon mit SP_{glpQ}, SP_{yknX} oder SP_{yolC} ausgewählt. Als Referenzen diente *P. polymyxa* DSM 292 mit pBACOV-*cel9D* (SP_{aprE}) bzw. pBACOV (Leervektor). Die Stämme wurden in Dreifachansätzen in 20 ml LB-S für 25 h inkubiert (37 °C, 180 rpm) und anschließend die OD₆₀₀ der Kulturen und die CMC_{Case}-Aktivität der Überstände (Inkubation: 90 min bei 60 °C, MOPS-Puffer pH 6,5) gemessen. Zudem wurden die Überstände per Western Blot untersucht (Abbildung 12). Die CMC_{Case}-Aktivität der Überstände der verschiedenen Klone unterschied sich nicht signifikant. Im Western-Blot war bei SP_{aprE}, SP_{yolC} und SP_{glpQ} eine eindeutige Bande auf Höhe des Referenzproteins (produziert in *E. coli*) zu erkennen. Die Bande des Klons mit SP_{yknX} war nur sehr schwach zu erkennen, lag jedoch ebenfalls auf der Höhe des Vollängenproteins. Das detektierte Molekulargewicht im Western-Blot entsprach in etwa dem theoretischen Molekulargewicht von Cel9D (69,5 kDa).

Somit war in diesen Proben das Zielprotein stabil und in voller Länge nachweisbar. Bei beiden getesteten Klonen mit SP_{ywjE} und bei der Negativkontrolle mit dem Leervektor war keine Bande zu erkennen, die Bande des Klons mit SP_{yknX} war nur sehr schwach erkennbar. Da der verwendete Antikörper (α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat) den C-terminalen His₆-tag nachweist, besteht bei den Proben mit SP_{ywjE} und SP_{yknX} die Möglichkeit, dass Cel9D am C-Terminus proteolytisch prozessiert war und damit zwar noch katalytisch aktiv war, jedoch im Western-Blot nicht detektierbar war. Somit konnten mit SP_{yolC} und SP_{glpQ} erfolgreich zwei SP identifiziert werden, die für eine sekretorische Produktion von stabilem Cel9D in *P. polymyxa* DSM 292 gut geeignet waren.

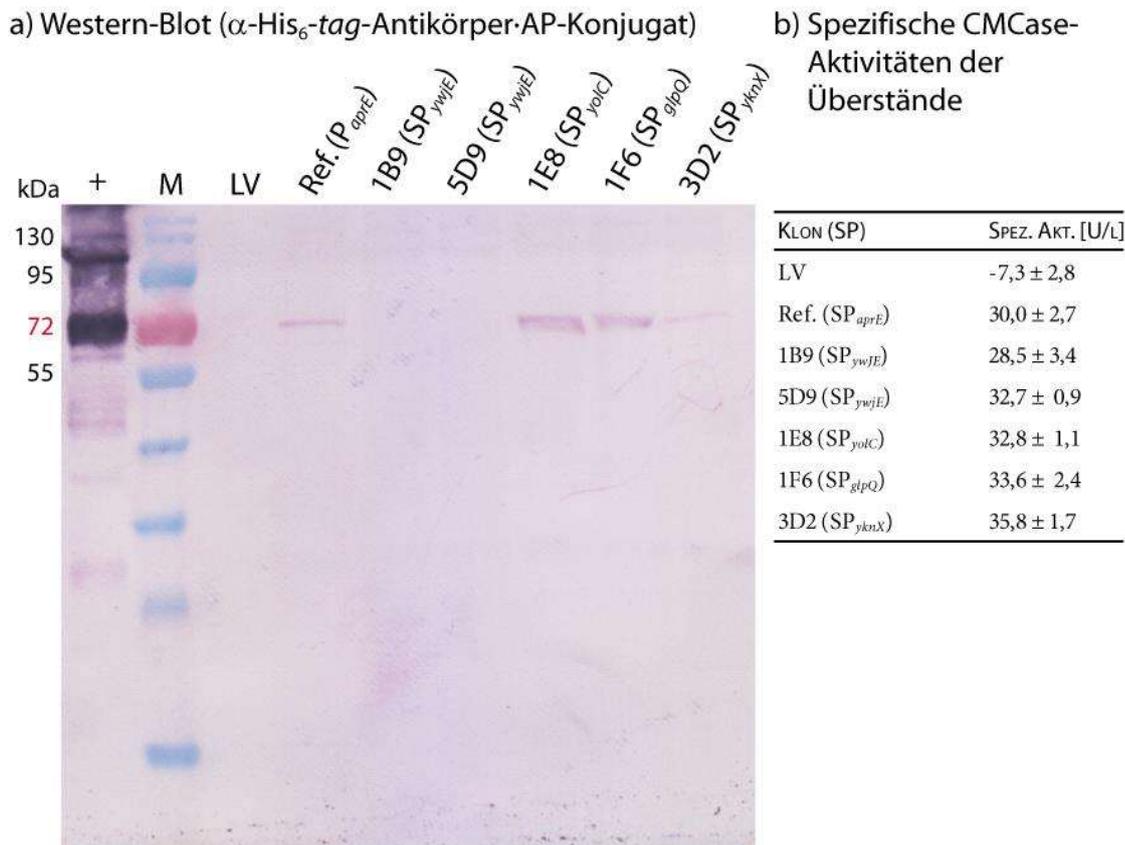


Abbildung 12: Untersuchung ausgewählter Klone aus der *cel9D*-SP-Bibliothek. Negativkontrolle: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV (Leervektor LV), Referenz: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-*cel9D* (SP_{aptE}). a) Untersuchung der Überstände mittels Western-Blot. Verwendeter Antikörper: α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat. Pro Spur wurden die mit TCA gefällten Proteine aus jeweils 750 μ l Kulturüberstand aufgetragen. +: Positivkontrolle, 1,5 μ g gereinigtes Cel9D, produziert in *E. coli* (69,5 kDa). M: Marker, PageRuler Prestained. b) CMCCase-Aktivitäten der Überstände von Klonen mit den verschiedenen ausgewählten SP der *cel9D*-SP-Bibliothek. Die Zellen wurden in je 3 \times 20 ml LB-S für 25 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Messung der CMCCase-Aktivität erfolgte mit der DNSA-Methode bei 60 °C, MOPS-Puffer pH 6,5 für 90 min. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

Da die ersten SP-Bibliotheken (Bib1) von *cel8A* und *cel9D* nicht als vollständig abgedeckt betrachtet werden konnten bzw. jeweils weniger als 1 000 Kolonien in den 96 Deep-Well-Blöcken getestet wurden, wurden für beide Zielgene eine zweite SP-Bibliothek (Bib2) erstellt. Die Durchmusterung erfolgte nun jedoch unter anderen Bedingungen. Statt LB-S wurde das optimierte Medium 2 (siehe Kapitel 3.2.6) verwendet. Statt Glucose kam Glycerin als C-Quelle zum Einsatz, um die Aktivitätsmessung per DNSA durchführen zu können. Die Inkubation der Blöcke erfolgte für 24 h bei 37 °C und 375 rpm. Aus der SP-Bibliothek *cel8A* Bib2 wurden 1 007 Klone getestet, aus *cel9D* Bib2

wurden alle erhaltenen 1 111 Klone getestet. Basierend auf der jeweiligen höchsten Aktivität im Überstand sowie die höchste Aktivität pro OD600 wurden 48 (*cel8A*) bzw. 46 (*cel9D*) Klone für die Sequenzierung ihrer SP ausgewählt. Bei *cel8A* konnte sieben Klone aufgrund schlechter Sequenzierqualität kein SP zugeordnet werden. Für *cel8A* wurden 28 verschiedene SP identifiziert, für *cel9D* waren es 20 (Tabelle 38). Je Signalpeptid wurde ein Klon für nähere Untersuchungen im Kölbchenmaßstab ausgewählt. Dazu wurden die Klone zunächst zum Animpfen von 20 ml Vorkulturen (LB) verwendet. Mit den Vorkulturen wurden dann 20 ml Hauptkulturen (Medium 2) auf eine Start-OD600 von 0,2 angeimpft und 24 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Als Referenzen dienten *P. polymyxa* DSM292 pBACOV (Leervektor) sowie die Stämme mit SP_{aprE} und den besten SP aus den ersten SP-Bibliotheken (*cel8A*: SP_{lipB}, *cel9D*: SP_{glpQ} und SP_{yotC}). Nach der Inkubation wurde die OD600 der Kulturen sowie die jeweilige Enzymaktivität im Überstand mittels Azo-CMC gemessen. Die Inkubation beim Azo-CMC Test wurde bei *Cel9D*, abweichend vom Standardverfahren, für 30 min bei 60 °C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Tabelle 38: Ergebnis der Sequenzierung ausgewählter Klone aus den SP-Bibliotheken *cel8A*-Bib2 und *cel9D*-Bib2. 1 007 Klone (*cel8A*) bzw. 1 111 Klone (*cel9D*) wurden in Medium 2 (C-Quelle: Glycerin) getestet. Es wurden 48 Klone (*cel8A*) bzw. 46 Klone (*cel9D*) für die Sequenzierung ausgewählt, dabei wurden 28 (*cel8A*) bzw. 20 (*cel9D*) verschiedene SP identifiziert.

CEL8A				CEL9D			
SP	Anzahl	SP	Anzahl	SP	Anzahl	SP	Anzahl
ykvV	5	yvpB	1	yraJ	19	dacB	1
phrC	3	amyE	1	mreC	3	mdr	1
glpQ	2	ylBL	1	ynzA(tatAC)	3	vpr	1
ypmB	2	fliL	1	fliL	2	ydjM	1
ybbE	2	yvbX	1	ybbC	2	yhcR	1
wprA	2	yckD	1	ychD	2	yjiA	1
yurI	2	ybdN	1	yolI (bdbA)	2	ypmS	1
ywfM	2	ywoF	1	amyE	1	yrrS	1
ybbC	2	csn	1	bglC	1	ywaD	1
phoA	1	mdr	1	csn	1	yycP	1
fliZ	1	yqgA	1				
yqxM	1	abnA	1				
ydhT	1	lipB	1				
yxiT	1	yngK	1				

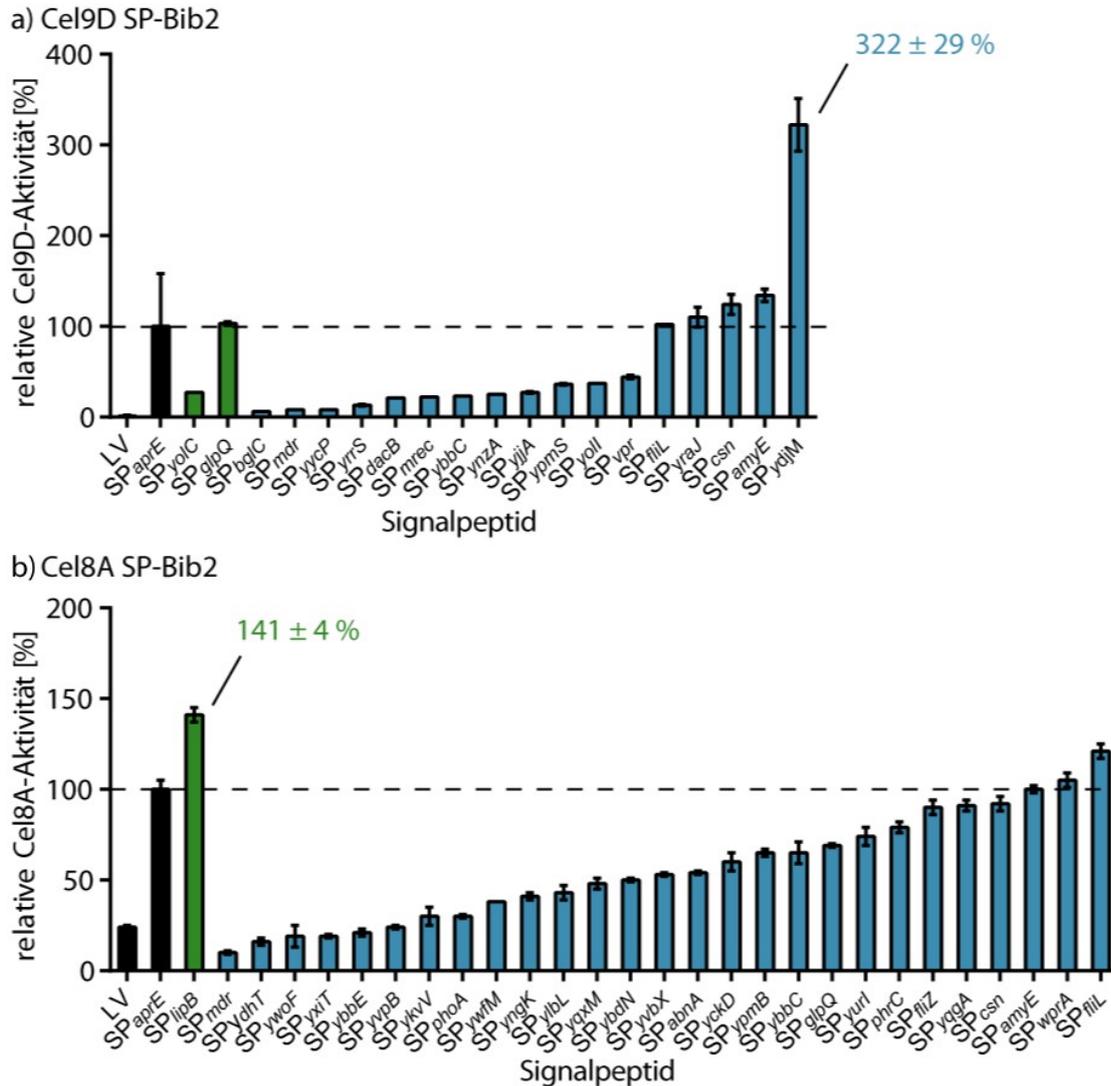


Abbildung 13: Untersuchung ausgewählter Klone aus der zweiten SP-Bibliothek (Bib2) für a) *cel9D* und b) *cel8A*. Die Klone wurden für 24 h bei 37 °C und 180 rpm in je 20 ml Medium 2 inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ und die CMCase-Aktivität des Überstandes mittels Azo-CMC gemessen. Die Aktivität mit SP_{aprE} wurde jeweils als 100 % definiert und wird zur Orientierung durch die horizontale, gestrichelte Linie angezeigt. Schwarze Balken: Referenzen: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV (LV) bzw. pBACOV-*cel8A* oder pBACOV-*cel9D*. Grüne Balken: Beste Klone aus *cel9D* SP-Bib1 bzw. *cel8A* SP-Bib1. Blaue Balken: Ausgewählte Klone aus *cel9D* SP-Bib2 bzw. *cel8A* SP-Bib2. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus Dreifachmessungen. Bei den Proben ohne Fehlerbalken in Abbildung a) wurde jeweils nur eine Einfachbestimmung durchgeführt.

Es war festzustellen, dass keines der SP, die aus der *cel8A* SP-Bib2 ausgewählt wurden, eine höhere Cel8A-Aktivität im Überstand hervorrief als das in SP-Bib1 identifizierte SP_{lipB}. Somit wurde dieses SP weiterhin als das beste SP für die sekretorische Cel8A-

Produktion angesehen. Mit SP_{amyE}, SP_{wprA} und SP_{fliL} wurden drei weitere SP identifiziert, die mindestens ebenso gut geeignet waren wie SP_{aprE}. Bei Cel9D wurden mit SP_{fliL}, SP_{yraJ} und SP_{amyE} drei SP identifiziert, bei denen ähnliche Cel9D-Aktivitäten im Überstand wie mit SP_{aprE} gemessen wurden. Besonders herausragend war jedoch SP_{ydjM}, mit einer mehr als dreifach erhöhten Cel9D-Produktion im Vergleich zu SP_{aprE}.

Für die Durchmusterung der SP-Bibliothek für *cel9R* wurden 420 Kolonien von *P. polymyxa* DSM 292 nach dem Transfer der Bibliothek gepickt und in 96-Deep-Well-Blöcke mit LB-S angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 40 h bei 30 °C und 375 rpm. Im Anschluss wurden die OD₅₉₅ und die Enzymaktivität des Überstandes gemessen. Als Substrat diente diesmal Gersten-β-Glucan (BBG), die Reaktion erfolgte für 3 h bei 78 °C in MOPS-Puffer, pH 6,5. Die Plasmid-DNA der elf besten Klone wurde isoliert und die jeweiligen SP mittels Sequenzierung bestimmt. Dabei wurden sechs verschiedene SP identifiziert, wobei SP_{ylaE} und SP_{ypmB} mit je drei Klonen am häufigsten vorkamen (Tabelle 39).

Tabelle 39: Ergebnis der Sequenzierung ausgewählter Klone der SP-Bibliothek für *cel9R*.

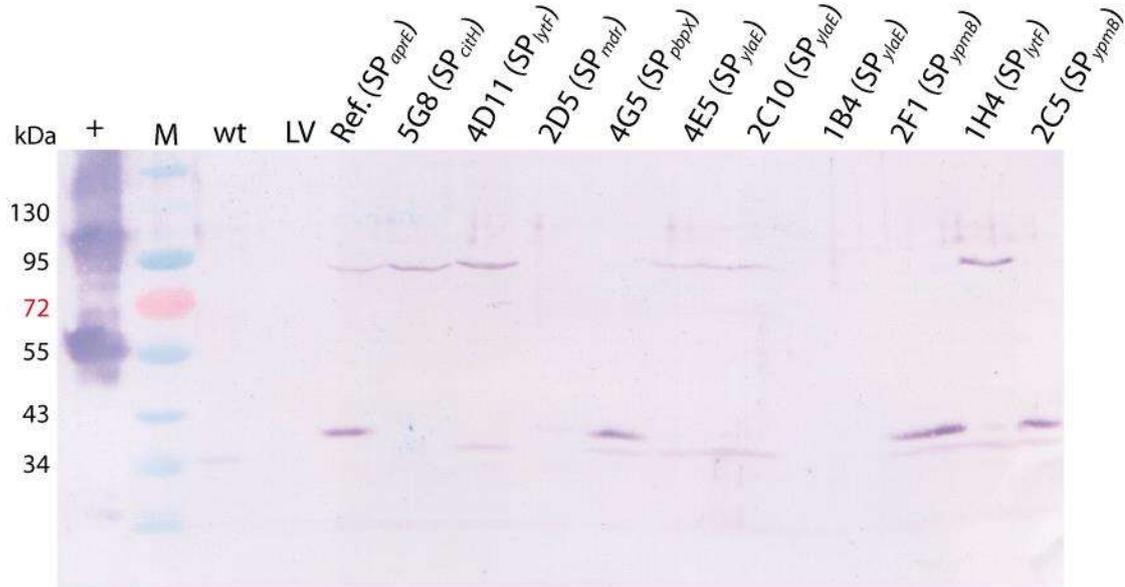
SP	ANZAHL
ylaE	3
ypmB	3
lytF	2
citH	1
mdr	1
pbpX	1

Zur genaueren Untersuchung wurden diese zehn Klone in je 20 ml LB-S angeimpft und für 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die BBGase-Aktivität der Überstände mittels DNSA (3 h bei 78 °C in MOPS-Puffer, pH 6,5) gemessen, sowie die Proben per Western-Blot mit α-His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat untersucht (Abbildung 14). Bei den Klonen mit SP_{citH} und SP_{lytF} sind im Western-Blot Banden zu erkennen, deren Größe sich anhand des Markers auf ca. 80 kDa abschätzen lässt. Dies entspricht dem theoretischen Molekulargewicht des Volllängenproteins Cel9R (81,0 kDa). Dabei

war die Bande bei Klon 1H4 (SP_{lytF}) am intensivsten. Da die als Positivkontrolle verwendete Charge von gereinigtem Cel9R (produziert in *E. coli*) offensichtlich verunreinigt oder degradiert war, war kein direkter Vergleich mit dem Referenzprotein möglich. In den Proben mit SP_{aprE} und zwei der drei Proben mit SP_{ylaE} waren sowohl schwach die Vollängenbande als auch eine Bande zwischen 34 kDa und 43 kDa zu erkennen. Dabei handelt es sich vermutlich um das C-terminale Fragment von proteolytisch gespaltenem Cel9R. Die Fragmentbande war auch bei SP_{pbpX} und SP_{ypmB} zu sehen. In der Probe mit SP_{mdr} sowie den beiden Negativkontrollen (LV und wt) waren keine Produktbanden zu erkennen.

Die Art und Intensität der Banden im Western-Blot deckt sich mit den Ergebnissen des Aktivitätstests. Die höchsten Aktivitäten wiesen die Proben mit SP_{citH} und SP_{lytF} auf (zwischen $51,0 \pm 3,5$ U/l und $58,7 \pm 1,4$ U/l), in denen auch die Bande des Vollängen-Cel9R am intensivsten war. Die Aktivität der Proben mit SP_{ylaE} und SP_{aprE} lag mit ca. 30-40 U/l darunter und die Aktivität der Klone mit SP_{mdr} , SP_{pbpX} und SP_{ypmB} war mit rund 20 U/l am geringsten. Mit SP_{lytF} und SP_{citH} konnten also erfolgreich zwei geeignete SP für die sekretorische Cel9R-Produktion in *P. polymyxa* DSM 292 identifiziert werden.

a) Western-Blot (α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat)



b) Spezifische BBGase-Aktivitäten der Überstände

KLON (SP)	SPEZ. AKT. [U/L]	KLON (SP)	SPEZ. AKT. [U/L]
LV	30,0 ± 2,5	4G5 (SP _{pbpX})	20,9 ± 1,0
Ref. (SP _{aptE})	30,6 ± 0,7	4E5 (SP _{ylaE})	38,5 ± 2,9
5G8 (SP _{citH})	58,7 ± 1,4	2C10 (SP _{ylaE})	36,1 ± 0,7
4D11 (SP _{lytF})	51,0 ± 3,5	1B4 (SP _{ylaE})	39,6 ± 0,5
1H4 (SP _{lytF})	52,6 ± 0,7	2F1 (SP _{ypmB})	19,5 ± 0,9
2D5 (SP _{mdr})	21,9 ± 1,1	2C5 (SP _{ypmB})	20,3 ± 2,8

Abbildung 14: Untersuchung ausgewählter Klone aus der *cel9R*-SP-Bibliothek. Negativkontrollen: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV (Leervektor LV) bzw. ohne Plasmid (wt), Referenz: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-*cel9R* (SP_{aptE}). a) Untersuchung der Überstände mittels Western-Blot. Verwendeter Antikörper: α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat. Pro Spur wurden die mit TCA gefällten Proteine aus jeweils 750 μ l Kulturüberstand aufgetragen. +: Positivkontrolle, 1 μ g gereinigtes Cel9R, produziert in *E. coli* (theoretisch: 81,0 kDa). M: Marker, PageRuler Prestained. b) BBGase-Aktivitäten der Überstände von Klonen mit den verschiedenen ausgewählten SP der *cel9R*-SP-Bibliothek. Die Zellen wurden in 20 ml LB-S für 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Messung der BBGase-Aktivität erfolgte mit der DNSA-Methode bei 78 °C, MOPS-Puffer pH 6,5 für 180 min. Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.

Die Prozedur für die Durchmusterung der *xgh74A*-SP-Bibliothek unterschied sich von dem Vorgehen für *cel8A*, *cel9D* und *cel9R*. Da *P. polymyxa* DSM 292 natürlicherweise eine hohe Abbauleistung gegenüber Xyloglucan (XG) aufweist, war ein XGase-Test zur

aktivitätsbasierten Bestimmung der Xgh74-Menge in Überständen aus *96-Deep-Well*-Blöcken nicht praktikabel. Deshalb wurde mit den Selektionsplatten des Transfers der *xgh74A*-SP-Bibliothek in *P. polymyxa* DSM 292 ein Kongorot-Test mit Xyloglucan-Topagar durchgeführt. Anhand der Hofgrößen der einzelnen Kolonien können hierbei halb-quantitative Rückschlüsse auf die Xgh74A-Sekretion gezogen werden. Für den Kongorot-Test wurden die Selektionsplatten mit den Kolonien von *P. polymyxa* DSM 292 mit der übertragenen *xgh74A*-SP-Bibliothek mittels Filterpapierstempeln auf je zwei frische LB-Agarplatten repliziert. Die Platten wurden für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde jeweils eine Kopie der Selektionsplatten für 4 h bei 60 °C vorinkubiert. Ein Vorversuch hatte ergeben, dass durch diese Vorinkubation die endogene XGase-Aktivität von *P. polymyxa* DSM 292 inaktiviert werden kann. Aufgrund der hohen Thermostabilität von Xgh74A (Zverlov et al., 2005b) konnte davon ausgegangen werden, dass Xgh74A nach der Behandlung noch aktiv war und die Aktivität für Hofbildung im Kongorot-Test ausreichte. Die vorinkubierten Agarplatten wurden mit XG-Topagar überschichtet und nach dessen Erstarren für weitere 2 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Kongorot-Färbung (siehe Kapitel 2.5.7). Bei einigen Kolonien waren Abbauhöfe sichtbar (Abbildung 15) und 23 dieser Kolonien wurden zur Identifizierung des jeweiligen SP ausgewählt. Dazu wurden die entsprechenden Klone auf den unbehandelten Replikatplatten identifiziert und in Flüssigkulturen übertragen. Die Flüssigkulturen wurden zur Isolation der Plasmid-DNA für die SP-Sequenzierung verwendet. Es wurden sieben verschiedene SP identifiziert, wobei SP_{ykwD} (13 Klone), SP_{ypcP} (4 Klone) und SP_{aprE} (2 Klone) mehrfach auftraten (siehe Tabelle 40).

Tabelle 40: Ergebnis der Sequenzierung ausgewählter Klone der SP-Bibliothek für *xgh74A*.

SP	ANZAHL
ykwD	13
ypcP	4
aprE	2
nprB	1
yjdB	1
ypbG	1
yhjA	1



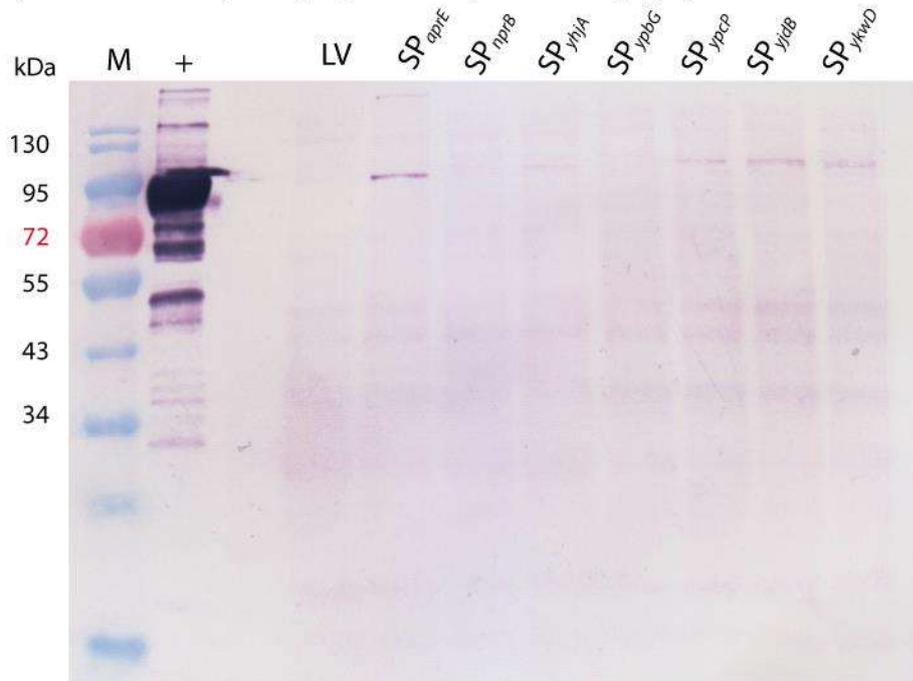
Abbildung 15: Beispielplatte der Durchmusterung der *xgh74A*-SP-Bibliothek. Die replizierten Platten wurden zur Hitzeinaktivierung der endogenen XGase-Aktivität von *P. polymyxa* DSM 292 für 4 h bei 60 °C vorinkubiert, anschließend mit XG-Topagar überschichtet und für weitere 2 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Kongorotfärbung zur Sichtbarmachung der Abbauhöfe. 23 Kolonien mit eindeutigen Abbauhöfen (Pfeile) wurden für die Identifikation ihrer SP ausgewählt.

Der Einfluss der identifizierten SP auf die sekretorische Xgh74A-Produktion wurde im Kölbchenmaßstab (20 ml) genauer untersucht. Dazu wurde je SP ein Klon ausgewählt und zum Animpfen von LB-Vorkulturen verwendet, welche zum Animpfen von Hauptkulturen (je 20 ml LB-S) auf eine Start-OD von 0,2 dienten. Als Negativkontrolle diente *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV (LV). Die Hauptkulturen wurden für 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 min bei 1 900 g abzentrifugiert und die Überstände für 3 h bei 60 °C vorinkubiert, um die endogene XGase-Aktivität von *P. polymyxa* DSM 292 zu inaktivieren. Im Anschluss wurde die XGase-Aktivität der Überstände, hervorgerufen durch das heterologe Xgh74A, mittels DNSA-Test gemessen (Substrat: Xyloglucan, Inkubation: 60 min bei 60 °C in MOPS-Puffer pH 6,5). Zudem wurden die Überstände mittels Western-Blot untersucht. Die

Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Aktivität aller Klone lag etwa zwischen 114 U/l und 150 U/l und war somit in allen Fällen vergleichbar. Dabei war die Aktivität des Klons mit SP_{aprE} 150,3 ± 3,1 U/l am höchsten, die niedrigste Aktivität wurde mit SP_{yjdB} gemessen (113,6 ± 1,3 U/l).

Der Western-Blot zeigte bei den Klonen mit SP_{aprE}, SP_{ypcP}, SP_{yjdB} und SP_{ykwD} Banden auf der zu erwartenden Höhe (theoretisches Molekulargewicht von Xgh74A: 90,8 kDa). Dabei waren die Banden bei den rekombinanten XGase-Varianten mit SP_{ypcP}, SP_{yjdB} und SP_{ykwD} nur schwach erkennbar, die Bande der Variante mit SP_{aprE} war am intensivsten. Somit konnte für vier SP eine erfolgreiche sekretorische Produktion von stabilem Xgh74A nachgewiesen werden. Aufgrund der höchsten Aktivität im Überstand und der stärksten Bande im Western-Blot erwies sich SP_{aprE} als das beste SP für die Produktion von Xgh74A in *P. polymyxa* DSM 292.

a) Western-Blot (α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat)



b) Spezifische XGase-Aktivitäten der Überstände

SP	SPEZ. AKT. [U/L]	SP	SPEZ. AKT. [U/L]
LV	56,4 ± 1,5	<i>ypbG</i>	131,2 ± 5,4
<i>aprE</i>	150,3 ± 3,1	<i>ypcP</i>	126,3 ± 6,6
<i>nprB</i>	136,2 ± 2,2	<i>yjdB</i>	113,6 ± 1,3
<i>yhjA</i>	131,6 ± 1,9	<i>ykwD</i>	124,9 ± 1,3

Abbildung 16: Untersuchung ausgewählter Klone aus der *xgh74*ASP-Bibliothek. Negativkontrolle: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV (Leervektor LV), Referenz: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-*xgh74A* (SP_{*aprE*}). a) Untersuchung der Überstände mittels Western-Blot. Verwendeter Antikörper: α -His₆-tag-Antikörper-AP-Konjugat. Pro Spur wurden die mit TCA gefällten Proteine aus jeweils 750 μ l Kulturüberstand aufgetragen. +: Positivkontrolle, 1,5 μ g gereinigtes Xgh74A, produziert in *E. coli* (theoretisch: 90,8 kDa). M: Marker, PageRuler Prestained. b) XGase-Aktivitäten der Überstände von Klonen mit den verschiedenen ausgewählten SP der *xgh74A*-SP-Bibliothek. Die Zellen wurden in 20 ml LB-S für 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Messung der XGase-Aktivität erfolgte mit der DNSA-Methode bei 60 °C, MOPS-Puffer pH 6,5 für 60 min. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.

3.2.4 Reinigung und Charakterisierung von Cel8A

Durch die Untersuchungen des Überstandes mittels Aktivitätstests und Western-Blot konnte für vier Testgene gezeigt werden, dass *P. polymyxa* DSM 292 als Produktionsstamm für heterologe Proteine verwendet werden kann. Um eine direkte

Aussage über die Qualität eines der gebildeten Produkte treffen zu können, sollte im nächsten Schritt das Zielprotein Cel8A aus dem Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) präpariert werden. Das so gewonnene Cel8A sollte dann charakterisiert werden.

P. polymyxa DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} wurde dazu in zwei 1 l Erlenmeyerkolben mit je 250 ml LB-S Medium für 24 h bei 37 °C und 180 rpm kultiviert (angeimpft von 20 ml LB-Vorkulturen). Im Anschluss wurde die OD₆₀₀ beider Kolben gemessen (Kolben 1: OD₆₀₀ = 2,161; Kolben 2: OD₆₀₀ = 2,072) und die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (3 124 g, 10 min). Die Überstände beider Kolben wurden vereinigt und direkt vollständig mittels einer ÄktaPurifier FPLC-Anlage bei einer Flussrate von 3 ml/min auf eine 5 ml HisTrap FF crude-Säule aufgetragen (Laufpuffer: 50 mM MOPS, pH 7,3, 0,3 M NaCl, 20 mM Imidazol, 20 mM CaCl₂; Elutionspuffer: 50 mM MOPS, pH 7,3, 0,1 M NaCl, 0,5 M Imidazol, 5 mM CaCl₂). Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten (Stufe 1: 50 % Laufpuffer, 50 % Elutionspuffer; Stufe 2: 100 % Elutionspuffer). Während der Elution wurden Fraktionen von je 1 ml gesammelt. Zudem wurden Proben des Überstandes und des Durchlaufs aufgefangen. Das Chromatogramm dieser Cel8A-Reinigung ist in Abbildung 17 dargestellt.

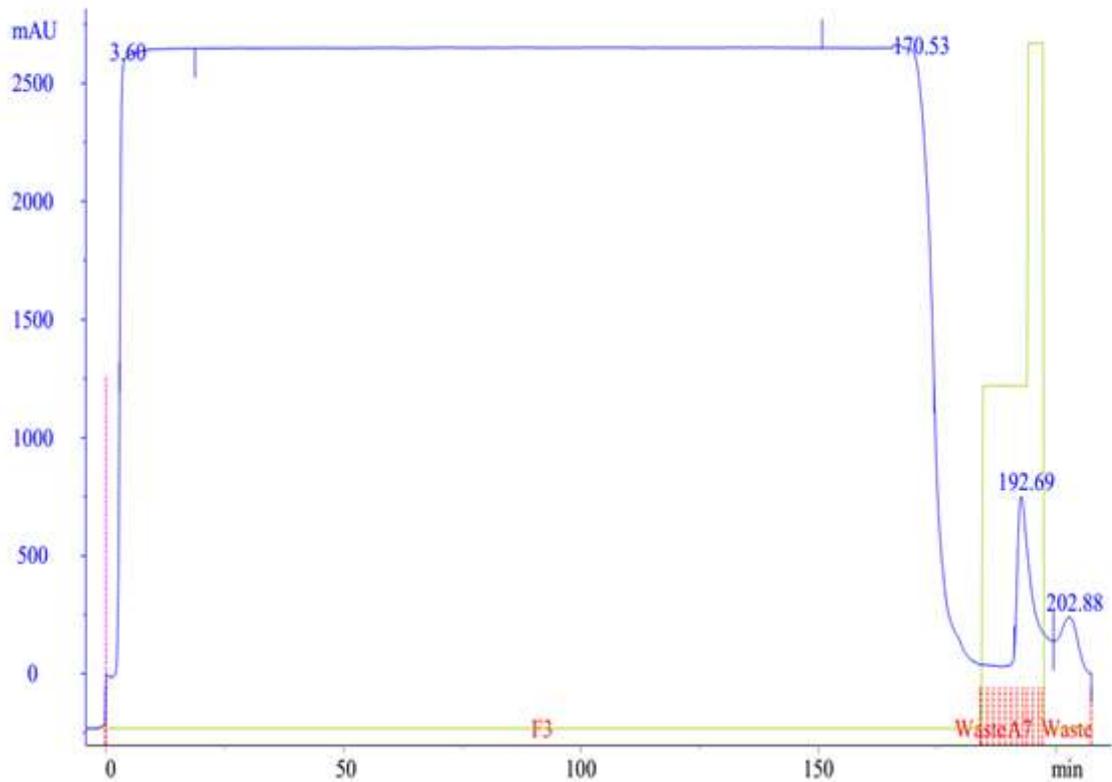


Abbildung 17: Chromatogramm der Reinigung von Cel8A aus dem Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-cel8A (ÄktaPurifier, 5 ml HisTrap FF crude Säule). Blau: UV-Absorption der Proteine bei 280 nm, grün: Konzentration des Elutionspuffers. Zu erkennen sind die beiden Elutionspuffer-Stufen mit 50 % bzw. 100 % Eluitonspuffer. Rot: Gesammelte Fraktionen. Der Eluat-Peak bei einer Retentionszeit von 192,60 min erstreckt sich über die Eluatsfraktionen A7 – A9, welche insgesamt 1,5 mg Cel8A enthielten.

Verschiedene Eluatsfraktionen, sowie der Überstand und der Durchlauf wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Die Fraktionen A7, A8 und A9 enthielten das Zielprotein, welches die erwartete Größe (im Vergleich zum Referenzprotein) aufwies und frei von Verunreinigungen war (Abbildung 18). Somit konnte das Zielprotein erfolgreich aus dem Überstand des Produktionsstammes isoliert werden.

Die Absorption der Fraktionen A7, A8 und A9 bei 280 nm wurde unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) gemessen. Zusammen mit dem Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} von Cel8A (ϵ_{280} unter reduzierenden Bedingungen = $104\,170\,1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, berechnet mittels EXPASy ProtParam, Gasteiger et al., 2005) ließ sich die Cel8A-

Konzentration der drei Proben berechnen. Es konnten insgesamt 1,5 mg gereinigtes Cel8A aus dem Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-cel8A gewonnen werden (Ausbeute: 3 mg/l Kultur).

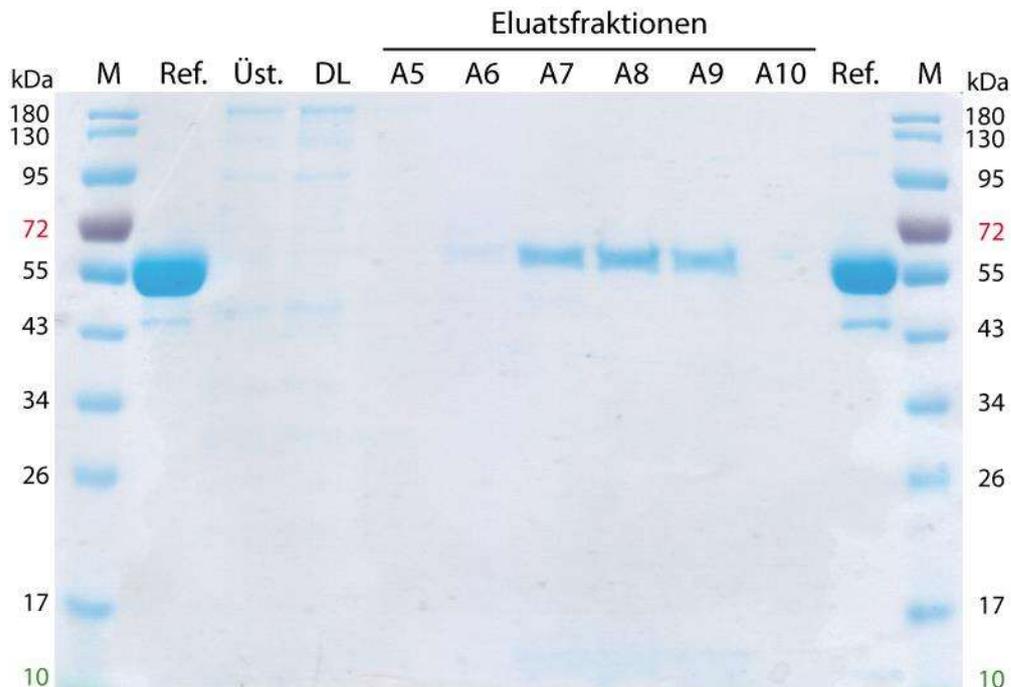


Abbildung 18: SDS-PAGE von Proben der Cel8A-Reinigung aus dem Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-cel8A mittels ÄktaPurifier und einer 5 ml HisTrap FF crude Säule. M: PageRuler Prestained, Ref.: Referenzprotein Cel8A, produziert in *E. coli*, Üst: zellfreier Kulturüberstand vor dem Auftragen auf die HisTrap FF crude Säule; DL: Durchlauf, A5 – A10: Eluatsfraktionen.

Das so gereinigte Cel8A wurde verwendet, um die spezifische Aktivität auf CMC und BBG zu untersuchen. Dafür wurden 5 µg Cel8A (bei CMC) bzw. 1 µg Cel8A (bei BBG) bei 60 °C in NaAc-Puffer (pH 5,0) in einem Gesamtvolumen von 150 µl mit 0,5 % des jeweiligen Substrats inkubiert. Als Referenz kam gereinigtes Cel8A (produziert in *E. coli*) zum Einsatz. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde die Enzymaktivität mittels DNSA gemessen. Dabei wurde ein Unterschied der spezifischen Aktivität zwischen Cel8A aus *E. coli* und Cel8A aus *P. polymyxa* DSM 292 festgestellt. Die spezifische Aktivität des Cel8A aus *E. coli* war bei beiden Substraten höher. Bei der Hydrolyse von BBG betrug die Aktivität von Cel8A aus *P. polymyxa* DSM 292 zwischen $15,2 \pm 0,8$

U/mg und $18,5 \pm 1,7$ U/mg und lag damit bei etwa 54 % bis 66 % der Aktivität des Cel8A aus *E. coli* ($28,0 \pm 2,1$ U/mg). Wurde CMC als Substrat verwendet, fiel der Unterschied geringer aus. Hier betrug die spezifische Aktivität von Cel8A aus *P. polymyxa* DSM 292 zwischen $0,80 \pm 0,03$ U/mg und $0,86 \pm 0,05$ U/mg, was 83 % bis 90 % der Aktivität von Cel8A aus *E. coli* entspricht ($0,96 \pm 0,06$ U/mg). Die nachgewiesenen Aktivitäten zeigen, dass die Isolierung von aktivem Cel8A aus dem Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} erfolgreich war.

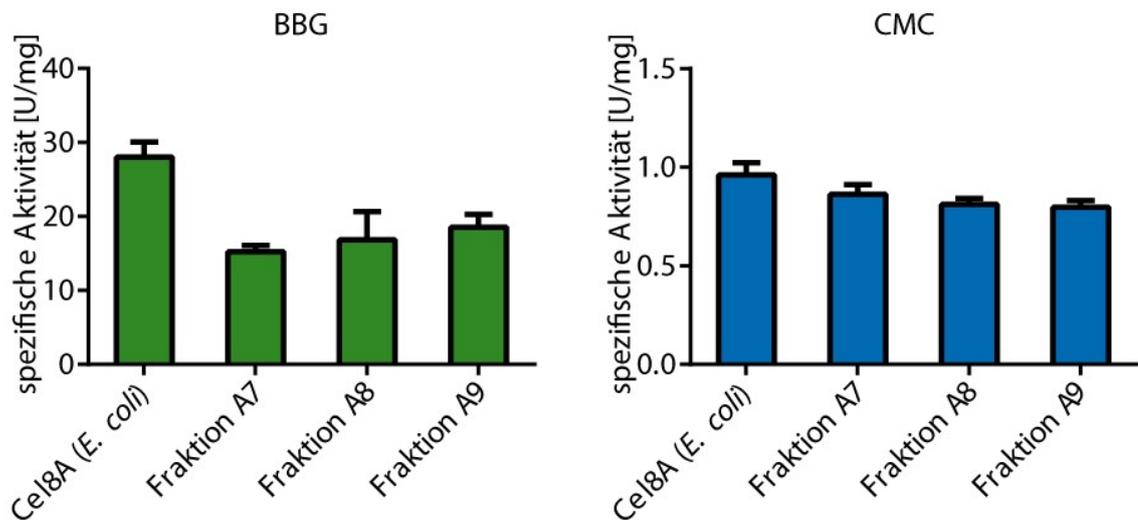


Abbildung 19: Spezifische Aktivitäten des gereinigten Cel8A auf BBG und CMC. Inkubationsbedingungen: 60 min bei 60 °C, NaAc-Puffer pH 5,0, Substratkonzentration: 0,5 % w/v. Eingesetzte Enzymmengen: 1 µg für den Abbau von BBG, 5 µg für den Abbau von CMC. Es wurden die Fraktionen A7, A8 und A9 der IMAC-Reinigung von Cel8A aus dem Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} verwendet (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Gereinigtes Cel8A, produziert in *E. coli*, diente als Referenz. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.

Neben der katalytischen Aktivität des GH8-Moduls besitzt Cel8A aufgrund des DocI-Moduls die Fähigkeit, einen Komplex mit den Cohesin-Modulen (Coh1-2) des cellulosomalalen Scaffoldin-Protein CipA auszubilden. Diese Komplexbildung ist eine weitere wichtige Eigenschaft von intaktem Cel8A. Um zu untersuchen, ob das hier gereinigte Cel8A zur Komplexbildung mit CipA fähig ist, wurden Komplexierungsversuche durchgeführt (Leis et al., 2017). Dazu wurden 15 µg gereinigtes Cel8A aus *E. coli* bzw. aus den Fraktionen A7 und A8 mit 0,7 µg CipA6.2,

welches über sechs Coh1-2 Module verfügt, inkubiert (60 min bei Raumtemperatur in GeFi-Puffer). Abweichend davon wurden beim Komplexierungsversuch mit Fraktion A9 aufgrund der geringeren Proteinkonzentration 9,4 µg Cel8A eingesetzt. Somit lag Cel8A im großen molaren Überschuss vor: das molare Verhältnis von Cel8A zu CipA6.2 betrug 53,7:1 (15 µg Cel8A) bzw. 33,6:1 (9,4 µg Cel8A). Da jedes CipA6.2-Molekül über sechs Cohesin-Module verfügt, können theoretisch sechs Cel8A-Moleküle an ein CipA6.2-Molekül andocken. Somit lag das molare Verhältnis von Cel8A zu Coh1-2 bei 8,9:1 (15 µg Cel8A) bzw. 5,6:1 (9,4 µg Cel8A). Zum Nachweis etwaiger Komplexe wurden die Proben auf native 12 %-ige PA-Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Zum Vergleich wurden sowohl CipA6.2 als auch Cel8A einzeln auf die Nativgele aufgetragen. Da es Probleme beim Anfärben der PA-Gele mit der Standard-Färbelösung gab, wurde von den Nativgelen ein Western-Blot (α -NC-Antikörper) angefertigt. Dieser polyklonale Antikörper ist gegen cellulosomale Proteine gerichtet und erkennt sowohl CipA6.2 als auch Cel8A. Bei allen Komplexierungsproben war eine Verschiebung der CipA6.2-Bande hin zu einem apparent höheren Molekulargewicht erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass das gereinigte Cel8A aus dem *P. polymyxa*-Überstand Komplexe mit CipA6.2 bilden kann und somit voll funktional ist.

Western-Blot

Primärer Antikörper: α -NC

Sekundärer Antikörper: α -Rabbit IgG (Fc)-AP-Konjugat

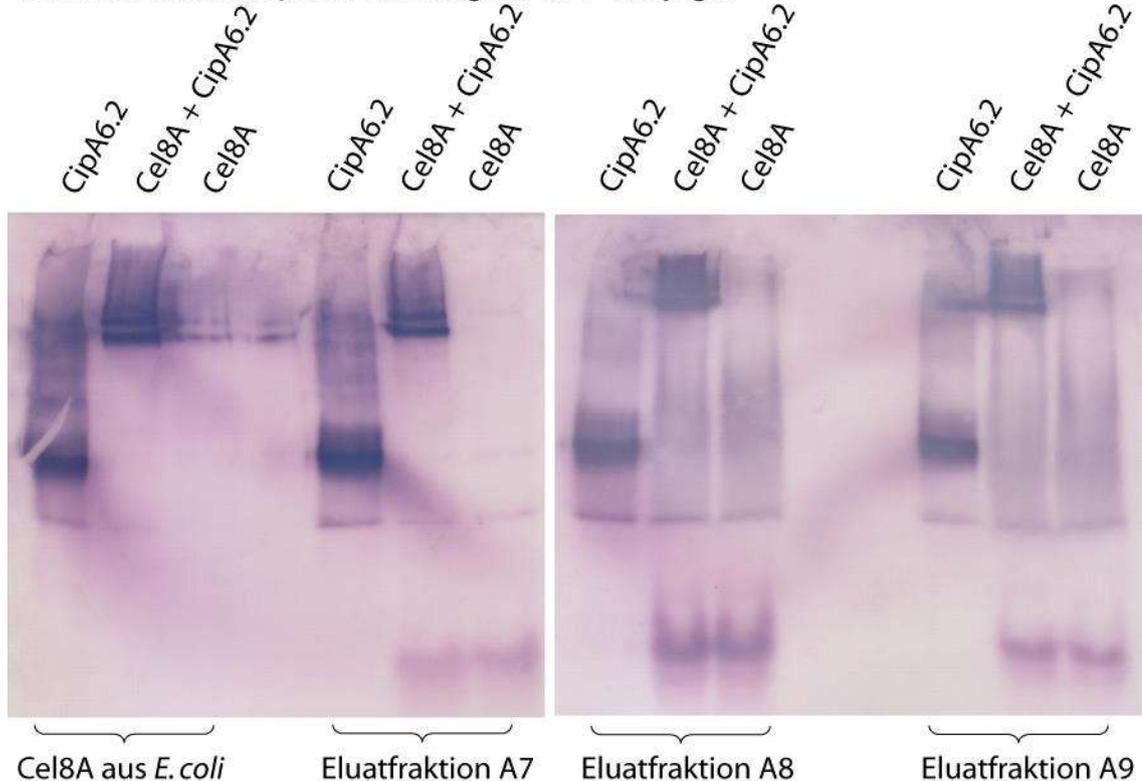


Abbildung 20: Komplexierung von CipA6.2 mit Cel8A aus dem Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 bzw. aus *E. coli* (Referenz). Es wurden die Eluatfraktionen A7, A8 und A9 aus der in Abbildung 18 dargestellten Reinigung verwendet. Spuren mit Bezeichnung „CipA6.2“ enthalten 0,7 μ g CipA6.2 (5,32 pmol). Spuren mit Bezeichnung „CipA6.2 + Cel8A“ enthalten die im Fließtext beschriebenen Komplexierungsansätze. Spuren mit Bezeichnung „Cel8A“ enthalten 15 μ g (294,4 pmol) Cel8A (Spur ganz rechts: 9,4 μ g Cel8A, entspricht 176,64 pmol). Die Ansätze wurden mittels nativer PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot sichtbar gemacht. Die Verschiebung der CipA6.2-Bande in den Komplexierungsansätzen im Vergleich zum reinen CipA6.2 zeigt die Komplexbildung zwischen CipA6.2 und Cel8A. In allen Ansätzen war das gleiche Ergebnis erkennbar, was zeigt dass das Cel8A aus den Eluatfraktionen A7, A8 und A9 die gleichen Komplexbildungseigenschaften aufweist wie das in *E. coli* produzierte Referenzprotein.

3.2.5 Koexpression von Chaperongen

Die Koexpression von Chaperongen ist eine weitere Möglichkeit, die Ausbeute an sekretierten Zielenzymen zu steigern (Chen et al., 2015; Westers et al., 2004; Wu et al., 2002). Insbesondere für die vermehrte Bildung der Chaperone DnaK und PrsA wurde in *B. subtilis* wiederholt gezeigt, dass dadurch die Ausbeute an sekretierten, heterologen

Proteinen gesteigert werden kann (Chen et al., 2015; Kontinen & Sarvas, 1999; Li et al., 2004; Wu et al., 1998).

Um den Einfluss der Koexpression von Chaperongenen auf die Ausbeute an sekretiertem Cel8A in *P. polymyxa* DSM 292 zu untersuchen, sollten *dnaK* bzw. *prsA* koexprimiert werden. Es wurden *dnaK* aus *H. thermocellum* und *P. polymyxa* DSM 292 sowie *prsA* aus *P. polymyxa* DSM 292 ausgewählt. In Zusammenarbeit mit einem anderen Doktoranden am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Herrn Jonathan Herlet) wurden Plasmide entwickelt, in denen je eines der drei Chaperon-Gene als bicistronisches Operon hinter *cel8A* in pBACOV-SP_{lipB}-*cel8A* vorlag. Diese Plasmide wurden von Jonathan Herlet kloniert und in dieser Arbeit charakterisiert.

Das Operon setzte sich aus folgenden Elementen zusammen: 5' SP_{lipB}-*cel8A*-*his6* – doppeltes Stop-Codon (TAATGA) – 25 bp Zwischensequenz mit RBS – Chaperon-Gen mit translational anfusioniertem *Strep*-tag II (Plasmidkarte von pBACOV-SP_{lipB}-*cel8A*-*dnaK*: siehe Abbildung 21). Der *Strep*-tag II ermöglichte es, die gebildeten Chaperone immunologisch mittels *Strep*-Tactin-AP im Western-Blot nachzuweisen.

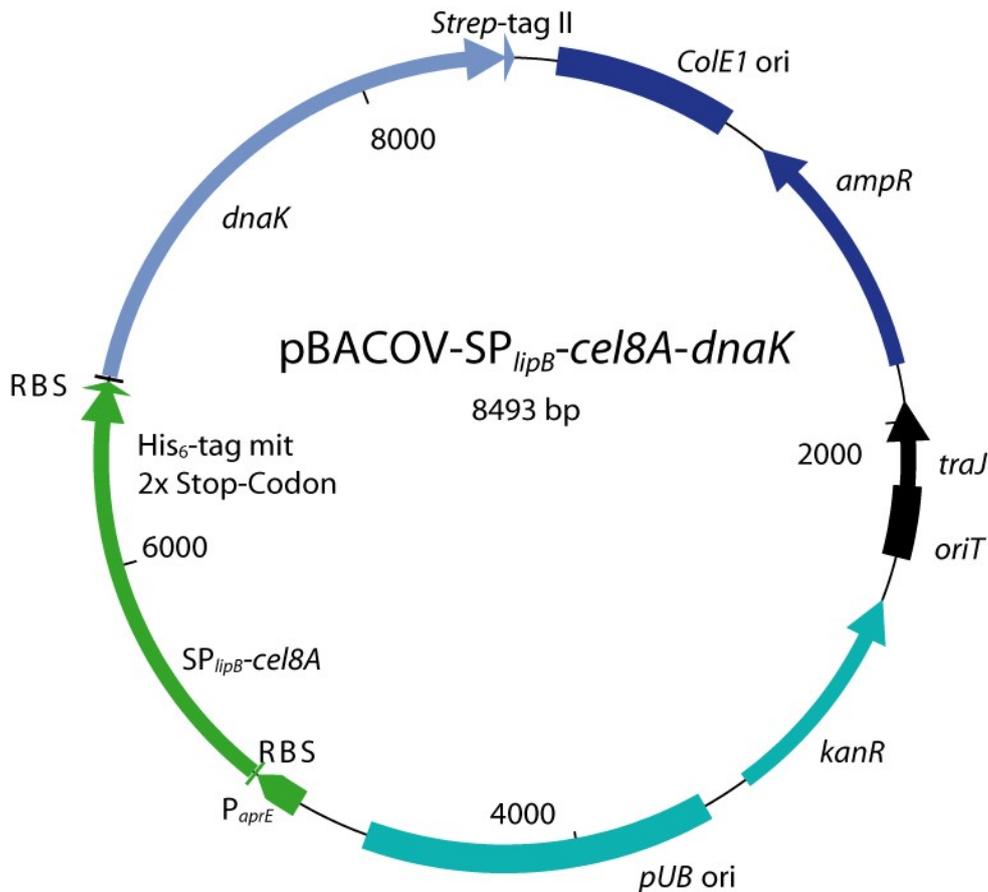


Abbildung 21: Plasmidkarte von pBACOV-SP_{lipB}-cel8A-dnaK. Die Gene *cel8A* und *dnaK* bilden ein Operon, das von P_{aprE} reguliert wird. Die 25-bp-Zwischensequenz zwischen den beiden Genen enthält eine RBS für die Translation von DnaK. Zum immunologischen Nachweis besitzt *cel8A* einen His₆-tag und *dnaK* einen Strep-tag II.

Die Koexpressionsplasmide wurden mittels triparentaler Konjugation in *P. polymyxa* DSM 292 übertragen. Je Konstrukt wurde ein Klon zur Charakterisierung in LB-S-Medium ausgewählt. Dafür wurde zuerst die relative CMC_{Case}-Aktivität im Kulturüberstand mittels der DNSA-Methode untersucht. Dabei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Stämmen mit und ohne koexprimiertem Chaperon (Abbildung 22a). Um zu überprüfen, ob die Chaperone tatsächlich koexprimiert wurden und das konstruierte Operon somit funktional war, wurden die Zellextrakte der verschiedenen Stämme mittels Western-Blot (*Strep*-Tactin-AP) untersucht (Abbildung 22b). Hier waren die erwarteten Banden im Western-Blot klar

erkennbar, was die erfolgreiche Expression der Chaperone aus dem bicistronischen Operon belegte. Somit war das konstruierte Operon funktional, aber die gebildeten Chaperone hatten keinen Einfluss auf die Ausbeute an korrekt gefaltetem Cel8A im Kulturüberstand (gemessen anhand der CMCCase-Aktivität).

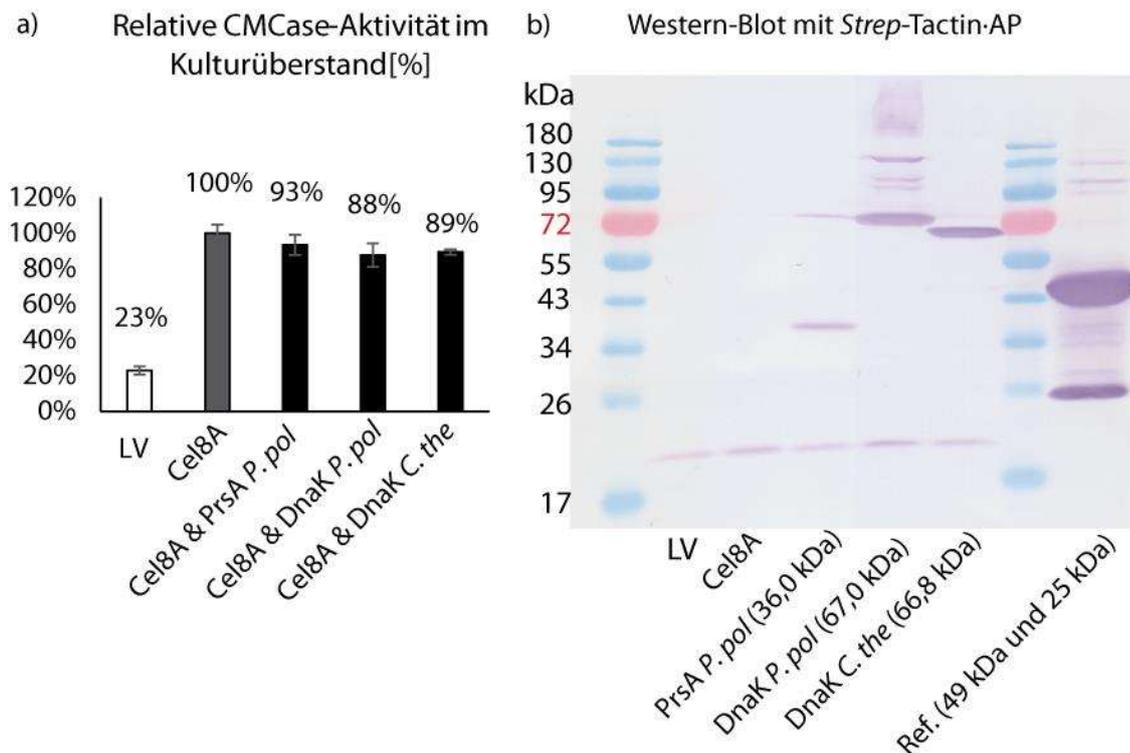


Abbildung 22: Einfluss koexprimierter Chaperone auf die sekretorische Cel8A-Produktion. Kulturüberstände und Zellextrakte von *P. polymyxa* DSM 292 mit verschiedenen Plasmiden wurden untersucht (LV: Leervektor pBACOV; Cel8A: pBACOV-SP_{lipB}-cel8A; Cel8A & PrsA *P. pol*: pBACOV-SP_{lipB}-cel8A-prsA aus *P. polymyxa* DSM 292; Cel8A & DnaK *P. pol*: pBACOV-SP_{lipB}-cel8A-dnaK aus *P. polymyxa* DSM 292; Cel8A & DnaK *C. the*:: pBACOV-SP_{lipB}-cel8A-dnaK aus *H. thermocellum*). a) Relative Aktivität der Kulturüberstände, gemessen mittels DNSA nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in LB-S. b) Western Blot zum Nachweis koexprimierter Chaperone. Analyse von Zellextrakten von *P. polymyxa* DSM 292 mit verschiedenen Plasmiden (erwartete Größen: PrsA *P. pol*: 36,0 kDa; DnaK *P. pol*: 67,0 kDa, DnaK *C. the*: 66,8 kDa). Zum Nachweis des *Strep*-tag II der Chaperone diente *Strep*-Tactin-AP. Ref.: Referenzproteine mit *Strep*-tag II, erwartete Größen: 49 kDa und 25 kDa.

3.2.6 Optimierung des Kulturmediums

Die Zusammensetzung des Kulturmediums kann einen entscheidenden Einfluss auf die Produktionsleistung haben. Daher wurden Versuche zur systematischen Optimierung des

Kulturmediums unternommen, um die Gesamtmenge an aktivem Cel8A im Medium zu erhöhen. Basierend auf Arbeiten von Aounallah et al. (2016), Häbler et al. (2012), Knight & Proom (1950), Riesenberg et al. (1991), Sonnleitner & Chmiel (2011), Spizizen (1958) und Wenzel et al. (2011) wurden elf Faktoren identifiziert, die in die Optimierung des Mediums einfließen sollten. Dazu wurde das halbdefinierte Anfangsmedium Medium 0 als Grundlage für die weitere Optimierung entwickelt. Die Faktoren 1–8 entsprechen verschiedenen Medienbestandteilen: Sojapepton, Glucose, Ammoniumsulfat, Phosphatpuffer, Magnesium, Calcium, Spurenelemente und Biotin. Bei den Faktoren 9–11 handelt es sich um die Inkubationsbedingungen Temperatur, pH-Wert und Belüftung (Verwendung von Schikanenkolben oder Erlenmeyerkolben). Zur Optimierung des Mediums wurde eine Plackett-Burman Matrix verwendet. Mittels Plackett-Burman Matrices kann die Kombination von n Faktoren mit nur n+1 Versuchen statistisch untersucht werden, sodass mit geringem experimentellem Aufwand eine Vielzahl an Einflussgrößen abgedeckt werden kann. Um die elf vordefinierten Faktoren zu untersuchen, wurden mittels der Plackett-Burman Matrix zwölf Medien konzipiert und getestet. Für jeden Faktor wurden dafür, zusätzlich zum Anfangswert (0), ein hoher (1) und ein niedriger (-1) Wert festgelegt. Die spezifizierten 1, -1 und 0-Werte jedes Faktors sind in Tabelle 41 aufgelistet.

Tabelle 41: Spezifizierte Faktoren und die jeweiligen niedrigen (-1), hohen (1) und Startwerte (0) für die Medienoptimierung mittels Plackett-Burman Matrix.

FAKTOR	MEDIENBESTANDTEIL	WERT		
		-1	0	1
1	Sojapepton [g/l]	0,5	5	5
2	Glucose [g/l]	10	20	30
3	(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/l]	2	4	7
4	Na/K PO ₄ -Puffer [mM]	25	100	200
5	MgSO ₄ × 7 H ₂ O [g/l]	0,1	0,5	1
6	CaCl ₂ × 2 H ₂ O [mg/l]	15	25	50
7	Spurenelementlösung (Anteil, v/v)	0,06 %	0,3 %	1,5 %
8	Biotin [mg/l]	0	0,03	0,15
9	pH-Wert	5,7	7,6	7
10	Temperatur [°C]	30	37	40
11	Belüftung (Schikanenkolben)	Nein	Nein	Ja

Um die Produktivität in allen zwölf Medien zu testen, wurden *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} und der Negativkontrollstamm mit pBACOV (Leervektor) in Dreifachansätzen für 24 h in allen Medien inkubiert und anschließend die OD₆₀₀ der Kulturen und die Cel8A-Aktivität im Kulturüberstand gemessen. Die bisher verwendete DNSA-Methode eignete sich nicht zur Messung der Enzymaktivitäten in den neuen Expressionsmedien, da DNSA reduzierende Zucker nachweist. Somit würden die Messwerte durch die in den neuen Medien enthaltene Glucose beeinflusst werden. Als Alternative wurde deshalb der Azo-CMC-Test angewendet. Als Substrat für endo- β -1,4-Glucanasen wird hierbei CMC, welche mit dem Farbstoff Remazolbrillantblau R konjugiert ist, eingesetzt (McCleary, 1980). Durch die enzymatische Hydrolyse des Substrats entstehen kurzkettenige Spaltprodukte, die nach Zugabe eines Präzipitationspuffers in Lösung bleiben, während ungespaltenes Substratpolymer ausfällt und so entfernt werden kann. Die Quantifizierung der Enzymaktivität erfolgt durch photometrische Messung der E₅₉₀ des (blauen) Überstandes (siehe Kapitel 2.7.7). Die verwendete Plackett-Burman Matrix und die erhaltenen Cel8A-Aktivitäten mit *P. polymyxa* DSM 292 sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Medienzusammensetzung hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Cel8A-Aktivität im Überstand. Während die Produktivität in den meisten getesteten Medien niedrig war, wurde mit Medium 2 eine fast fünffache Aktivitätssteigerung im Vergleich zu Medium 0 erzielt. Gegenüber LB-S war die Aktivität 1,8-fach höher. Die genaue Zusammensetzung von Medium 2 ist in Tabelle 9 angegeben. Aus der Plackett-Burman Matrix geht hervor, dass Medium 2 ursprünglich bei 40 °C getestet wurde. Anschlussexperimente zeigten jedoch, dass *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} in Medium 2 innerhalb von 24 h bei einer Temperatur von 37 °C eine höhere OD₆₀₀ erreichte als bei 40 °C. Damit einher ging auch eine höhere Cel8A-Produktion. Somit konnte mittels eines systematischen Optimierungsansatzes erfolgreich ein verbessertes Expressionsmedium entwickelt werden. Medium 2 bei 37 °C wurde als das mit Abstand beste Expressionsmedium für weitere Experimente ausgewählt.

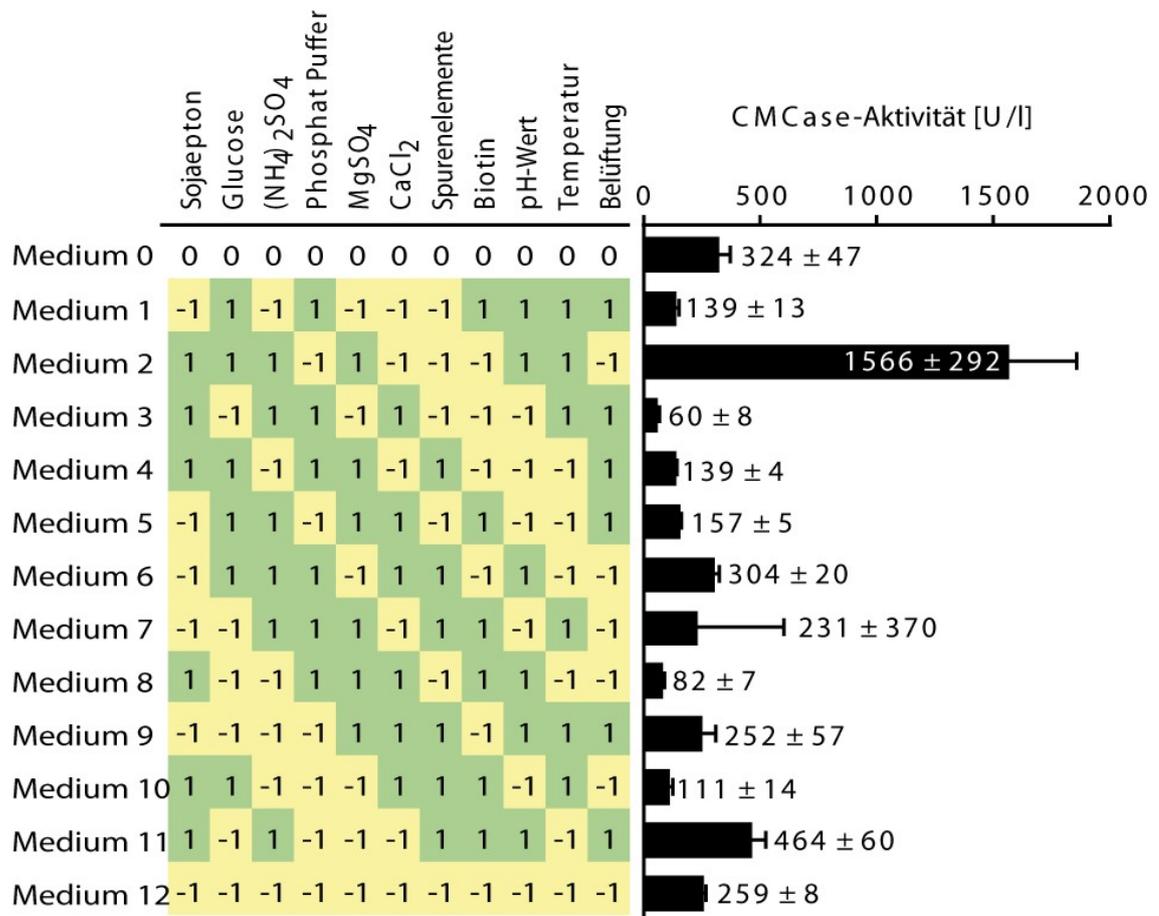


Abbildung 23: Plackett–Burman Matrix zur Medienoptimierung und die im jeweiligen Medium erzielten CMCase-Aktivitäten im Überstand *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-cel8A. Zwölf Medien wurden entwickelt, um verschiedene Kombinationen der elf spezifizierten Faktoren (Tabelle 41) zu testen. Die Zahlen zeigen den jeweiligen Wert eines gegebenen Faktors an: 0: Startwert, -1: niedriger Wert, 1: hoher Wert. Um die Cel8A-Produktion in jedem Medium zu testen, wurde *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-cel8A für 24 h bei 180 rpm in jedem Medium inkubiert. Im Anschluss wurden die OD₆₀₀ und die Cel8A-Aktivität im Überstand gemessen (Azo-CMC). Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

3.2.7 Produktionssteigerung durch alternative Promotoren

Die Entwicklung neuer Promotoren sowie die Identifizierung von geeigneten bekannten Promotoren sind häufig verfolgte Ansätze bei der Expression heterologer Gene. Entsprechend wurden verschiedene Strategien verfolgt, um Promotoren zu finden, mit denen sich die sekretorische Cel8A-Produktion in *P. polymyxa* DSM 292 steigern ließ. Dabei wurde zum einen auf bereits bekannte Promotoren aus der Fachliteratur

zurückgegriffen. Zum anderen wurde eine innovative Strategie zur Identifikation vielversprechender Promotoren aus dem Genom von *P. polymyxa* DSM 292 verfolgt, die auf der Hypothese beruhte, dass Promotoren, welche die Produktion stark sekretierter Wirtsproteine regulieren, aussichtsreiche Kandidaten für die sekretorische Expression heterologer Gene sind. Um derartige Promotoren zu finden, wurde das Sekretom von *P. polymyxa* DSM 292 mit Unterstützung durch die BayBioMS Core Facility (TUM, Freising-Weihenstephan) mittels quantitativer Massenspektrometrie untersucht, um stark sekretierte Wirtsproteine zu identifizieren. Die Promotoren, welche die Expression der entsprechenden Gene regulierten, wurden als erfolgsversprechende Elemente für die sekretorische Cel8A-Produktion ausgewählt und getestet. Die in diesem Kapitel angewendete Vorgehensweise ist in Abbildung 24 dargestellt. Als Ausgangsplasmid für die weitere Optimierung diente pBACOV-SP_{lipB-cel8A}. *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} wurde entsprechend als Referenzstamm eingesetzt. Die Auswahl der Promotoren und die Planung der Klonierung erfolgten in Zusammenarbeit mit Kerstin Zimmermann und Dr. Petra Kornberger (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TUM). Die Klonierungsarbeiten wurden von Kerstin Zimmermann und Dr. Petra Kornberger durchgeführt. Die Ergebnisse der Charakterisierung von P_{xyIA}, P_{xyIA+}, P₄₃, P_{x43P}, P_{trnQ} und P_{ylb} stammen aus der Masterarbeit von Kerstin Zimmermann. Die Planung und Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchung sowie die Charakterisierung der anhand dieser Daten ausgewählten Promotoren wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Insgesamt wurden 16 Plasmide mit neuen Promotoren und/oder Signalpeptiden von pBACOV-SP_{lipB-cel8A} abgeleitet. Die Plasmide wurden dann in *P. polymyxa* DSM 292 übertragen, um den Einfluss der jeweiligen Promotoren auf die Cel8A-Sekretion zu untersuchen. Da *P. polymyxa* bisher noch nicht als Stamm für die Expression heterologer Gene verwendet wurde, ist wenig über wirtseigene Promotorsysteme bekannt. Daher wurden zunächst gut charakterisierte Promotoren aus anderen *Bacillus*-Spezies getestet. Dabei wurden starke und gut kontrollierbare Promotoren ausgewählt. Darüber hinaus wurden basierend auf einer quantitativen Sekretomanalyse in Medium 2 weitere Promotoren aus dem Genom von *P. polymyxa* DSM 292 ausgewählt und in Kombination

mit dem originalen SP des jeweiligen Proteins sowie SP_{lipB} getestet. Tabelle 42 gibt eine Übersicht der in diesem Kapitel erstellten und verwendeten Plasmide, Promotoren und SP.

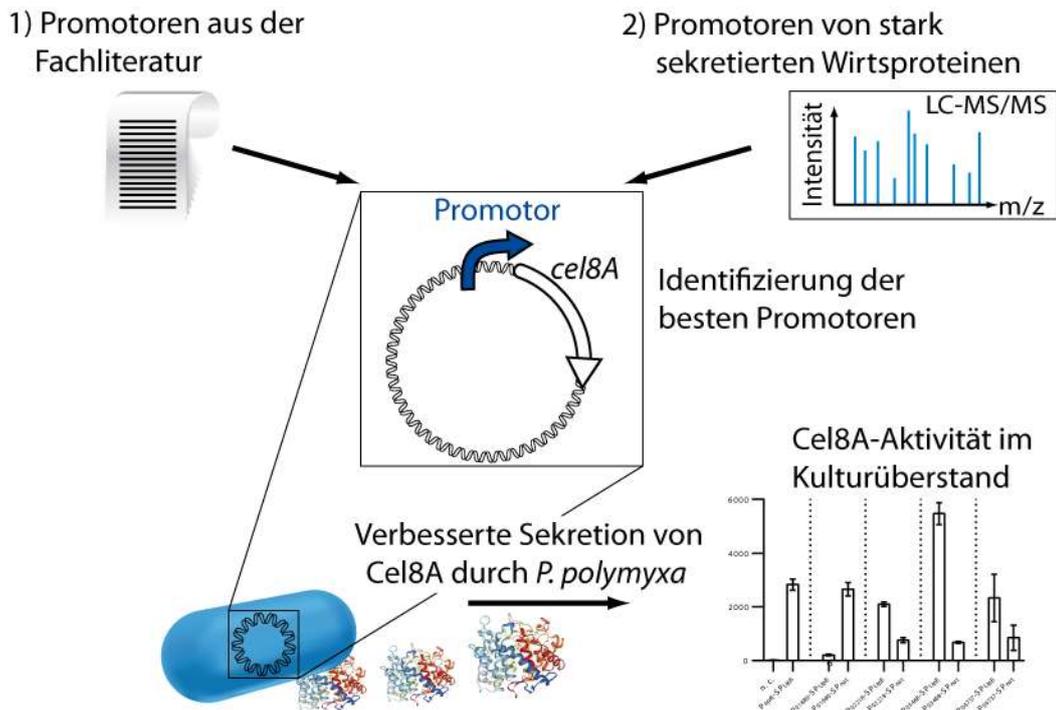


Abbildung 24: Vorgehensweise zur Optimierung der sekretorischen *cel8A*-Expression in *P. polymyxa* DSM 292 durch alternative Promotoren. Um die Gesamtmenge an sekretiertem Cel8A zu erhöhen, wurden verschiedene Promotoren getestet. Zum einen handelte es sich um gut charakterisierte, publizierte Promotoren aus *B. subtilis* und *B. megaterium* (1). In einem zweiten Ansatz (2) wurden zudem mittels quantitativer LC-MS/MS stark sekretierte Wirtsproteine identifiziert. Die Promotoren der jeweiligen Gene wurden kloniert und getestet. Die Leistungsfähigkeit jedes Promotors wurde anhand der Cel8A-Aktivität im Kulturüberstand bewertet (gemessen mittels Azo-CMC). Die abgebildete Proteinstruktur von Cel8A (PDB-ID: 1CEM) wurde von Alzari et al. (1996) veröffentlicht.

Um P_{aprE} in $pBACOV-SP_{lipB}-cel8A$ durch andere Promotoren zu ersetzen, wurde das Plasmid mit *SpeI* und *MluI*-HF (New England Biolabs) linearisiert. Sollten P_{aprE} und SP_{lipB} durch alternative Promotor- und SP-Sequenzen ersetzt werden, erfolgte der Restriktionsverdau mit *SpeI* und *EagI*-HF (New England Biolabs). Die Promotorsequenzen wurden aus genomischer DNA von *B. subtilis* RIK1285 (Clontech

Laboratories) bzw. *P. polymyxa* DSM 292 mittels präparativer PCR vervielfältigt. Die Promotoren P_{xylA} und P_{xylA+} wurden durch PCR mit dem Plasmid pHIS1525 (Mobitec GmbH) als Vorlage gewonnen. Die Ribosombindestelle (RBS) von P_{xylA} wurde von Malten et al. (2005) optimiert, der Promotor mit der so entstandenen verbesserten Ribosombindestelle (rbs^+) ist P_{xylA+} . Die entsprechenden Mutationen wurden bei der Amplifikation von P_{xylA+} aus pHIS1525 durch gezielte falsche Basenpaarungen im *Reverse Primer* $P_{xyl_RBS+_Gibson_rv}$ eingeführt. Die Primersequenzen sind in Material & Methoden angegeben. Die Promotorsequenzen wurden mittels Gibson-Assembly in den linearisierten Vektor eingefügt und durch Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 42: Plasmide zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Promotorsequenzen auf die sekretorische Cel8A-Produktion in *P. polymyxa* DSM 292. Die Promotoren aus dem *P. polymyxa* DSM292 Genom wurden auf Grundlage einer quantitativen Sekretomanalyse ausgewählt, mit Ausnahme von P_{43P} . Das kommerziell erhältliche Plasmid pHIS1525 (Mobitec GmbH) diente als Vorlage zur Klonierung von P_{xylA} und P_{xylA+} . Genomische DNA von *B. subtilis* RIK1285 diente als Vorlage zur Klonierung von P_{43} , P_{yib} und P_{trnQ} .

PLASMID	PROMOTOR	SP	ANMERKUNG	REFERENZEN UND GENBANK ACCESSION NUMBERS
PLASMID ZUR VERWENDUNG ALS PCR-VORLAGE				
pHIS1525	P_{xylA}		Diente als Ausgangsvektor für die Umklonierung von P_{xylA} und P_{xylA+}	Rygas & Hillen, 1991; Malten et al., 2005; Stammen et al., 2010
REFERENZPLASMIDE				
pBACOV	P_{aprE}	SP_{aprE}		Ferrari et al., 1988; Heinze et al., 2018a; Jan et al., 2000 GenBank: MG599120
pBACOV- SP_{lipB} - <i>cel8A</i>	P_{aprE}	SP_{lipB}		GenBank: MH328009
PLASMIDE MIT INDUZIERBAREN PROMOTOREN AUS DER LITERATUR				
p P_{xylA} - <i>cel8A</i>	P_{xylA}	SP_{lipB}	Xylose-induzierbares <i>xyl</i> -Operon aus <i>B. megaterium</i> (P_{xylA} -Promotor, XylR-Repressor)	Rygas & Hillen, 1991 GenBank: MH328011
p P_{xylA+} - <i>cel8A</i>	P_{xylA+}	SP_{lipB}	P_{xylA} mit optimierter, synthetischer Ribosombindestelle (rbs^+)	Malten et al., 2005; Stammen et al., 2010 GenBank: MH328012
PLASMIDE MIT CHARAKTERISIERTEN <i>B. SUBTILIS</i>-PROMOTOREN AUS DER LITERATUR				
p P_{43} - <i>cel8A</i>	P_{43}	SP_{lipB}	Konstitutiver Promotor	Wang & Doi, 1984 GenBank: MH328013
p P_{trnQ} - <i>cel8A</i>	P_{trnQ}	SP_{lipB}	Konstitutiver Promotor	Song et al., 2016

pPylb- <i>cel8A</i>	P _{ylb}	SP _{lipB}	Auto-induzierbarer Promotor	GenBank: MH328014 Yu et al., 2015 GenBank: MH328015
PLASMIDE MIT PROMOTOREN AUS DEM GENOM VON <i>P. POLYMYXA</i> DSM 292				
pP43P- <i>cel8A</i>	P _{43P}	SP _{lipB}	Promotor des <i>cdd</i> -Gens von <i>P. polymyxa</i> DSM 292, homolog zum P ₄₃ -regulierten <i>B. subtilis</i> <i>cdd</i> -Gen	GenBank: MH328016
pP01680-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	P ₀₁₆₈₀	SP _{lipB}	Promotor des ORF 01680 aus <i>P. polymyxa</i> DSM 292	GenBank: MH328017
pP01680-SP _{nat} - <i>cel8A</i>	P ₀₁₆₈₀	SP ₀₁₆₈₀	Gleicher Promotor wie pP01680-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	GenBank: MH328018
pP02218-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	P ₀₂₂₁₈	SP _{lipB}	Promotor des ORF 02218 aus <i>P. polymyxa</i> DSM 292	GenBank: MH328019
pP02218-SP _{nat} - <i>cel8A</i>	P ₀₂₂₁₈	SP ₀₂₂₁₈	Gleicher Promotor wie pP02218-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	GenBank: MH328020
pP03468-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	P ₀₃₄₆₈	SP _{lipB}	Promotor des ORF 03468 aus <i>P. polymyxa</i> DSM 292	GenBank: MH328021
pP03468-SP _{nat} - <i>cel8A</i>	P ₀₃₄₆₈	SP ₀₃₄₆₈	Gleicher Promotor wie pP03468-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	GenBank: MH328022
pP04737-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	P ₀₄₇₃₇	SP _{lipB}	Promotor des ORF 04737 aus <i>P. polymyxa</i> DSM 292	GenBank: MH328023
pP04737-SP _{nat} - <i>cel8A</i>	P ₀₄₇₃₇	SP ₀₄₇₃₇	Gleicher Promotor wie pP04737-SP _{lipB} - <i>cel8A</i>	GenBank: MH328024

Zunächst wurden die Expressionsplasmide pPxylA-*cel8A*, pPxylA⁺-*cel8A*, pP43-*cel8A*, pPtrnQ-*cel8A*, pPylb-*cel8A*, and pP43P-*cel8A* in *P. polymyxa* DSM 292 übertragen. Die resultierenden Stämme wurden in 20 ml LB-S kultiviert, um die Cel8A-Produktion zu vergleichen. Das Expressionsniveau hängt von der Stärke der Promotoren ab und wurde anhand der erhaltenen Cel8A-Aktivität im Kulturüberstand mit der Azo-CMC-Methode gemessen. Als Referenz diente P_{aprE}.

Die Xylose-induzierbaren Promotoren P_{xyLA} und P_{xyLA}⁺ leiten sich vom *xyl*-Operon aus *B. megaterium* ab. Die Sequenz von P_{xyLA} ist mit der Originalsequenz aus *B. megaterium* identisch und wurde in Kombination mit dem Gen für den XylR-Repressor verwendet. XylR inhibiert die Transkription, sofern keine Xylose vorhanden ist. Wird das Medium mit Xylose versetzt, löst sich XylR von der Promotorsequenz, wodurch die Transkription induziert wird. Die Sequenz von P_{xyLA}⁺ ist von P_{xyLA} abgeleitet und weist eine für *B. megaterium* optimierte Ribosombindestelle (*rbs*⁺) auf (Abbildung 25, Malten et al., 2005).

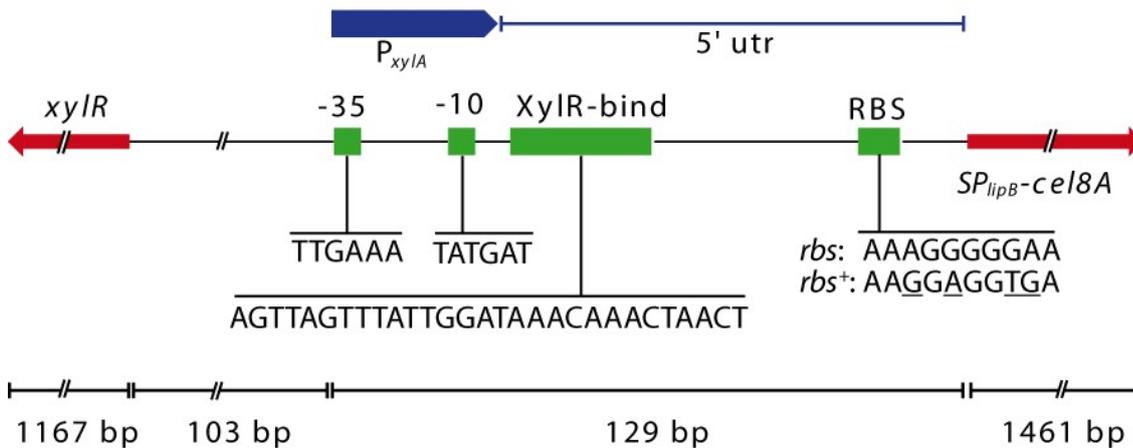


Abbildung 25: Übersicht der Elemente von P_{xylA} und P_{xylA+} und ihrer Anordnung. Rot: Proteinkodierende Sequenzen; grün: regulatorische Elemente; blau: Promotorbereich, 5' *untranslated region* (5' utr) in blau. P_{xylA} verfügt über die Ribosombindestelle *rbs*, während P_{xylA+} durch *rbs+* gekennzeichnet ist. Sequenzinformationen nach Stammes et al., 2010.

Um die Promotoren P_{xylA} und P_{xylA+} zu vergleichen, wurden Transkonjuganten mit den jeweiligen Plasmiden in LB-S-Medium kultiviert. Bei einer OD_{600} von 0,3 wurde die Expression durch Zugabe von Xylose (Endkonzentration: 0,5 % w/v) induziert. Nach einer Inkubationsdauer von insgesamt 24 h wurde die Cel8A-Aktivität im Überstand mittels Azo-CMC gemessen (Tabelle 43). Die Verwendung des Promotors P_{xylA} führte weder mit noch ohne Zugabe von Xylose zu einer feststellbaren *cel8A*-Expression. Im Gegensatz dazu erreichte die CMC-Case-Aktivität im Überstand von Zellen mit Plasmid pP_{xylA+} -*cel8A* nach Induktion mit Xylose etwa 74 % der Aktivität der Referenz (P_{aprE}). Ohne Xylosezugabe war keine CMC-Case-Aktivität feststellbar, was auf eine strenge Regulierung der Expression durch P_{xylA+} schließen lässt.

Tabelle 43: Xylose-induzierbare, sekretorische Cel8A-Produktion mittels *P. polymyxa* DSM 292 Klonen mit den Expressionsplasmiden pPxylA-*cel8A* (P_{xyIA}) oder pPxylA+-*cel8A* (P_{xyIA+}) in LB-S-Medium. Negativkontrolle: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV (Leervektor, LV). Referenz: *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-*cel8A*. Die spezifische Cel8A-Aktivität der Kulturüberstände wurde mittels Azo-CMC gemessen. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung aus drei Replikaten.

	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT [U/L]	
	OHNE	+ 0,5 %
	XYLOSE	XYLOSE
Referenz (P _{aprE})	884 \pm 29,0	
LV	19,4 \pm 1,8	11,5 \pm 4,2
P _{xyIA}	23,5 \pm 3,6	11,8 \pm 5,6
P _{xyIA+}	20,7 \pm 4,8	651 \pm 122

Die Konstrukte mit den konstitutiven *B. subtilis*-Promotoren P₄₃ und P_{tmQ} sowie dem *P. polymyxa* DSM 292-Promotor P_{43P} lieferten keine messbare *cel8A*-Expression in *P. polymyxa* DSM 292. Nach Inkubation in LB-S konnte das Zielprotein weder im Kulturüberstand noch im Zellpellet nachgewiesen werden. Dabei wurden die Proben sowohl mittels der Azo-CMC-Methode als auch mittels Western-Blot untersucht (Nachweis des C-terminales His₆-tags durch ein α -His₆-Antikörper-AP-Konjugat). Da der Referenzstamm (*P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-*cel8A*) und der Negativkontrollstamm (*P. polymyxa* DSM 292 pBACOV) die erwarteten Ergebnisse lieferten, können falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Der auto-induzierbare Promotor P_{ylb} lieferte bei Kultivierung in LB-S Medium im Vergleich zu P_{aprE} eine erhöhte extrazelluläre Cel8A-Aktivität. Im Kulturüberstand von *P. polymyxa* DSM 292 pPylb-*cel8A* wurde eine CMC-Case-Aktivität von 2 082 \pm 249 U/l gemessen, eine 2,3-fache Erhöhung im Vergleich zum Referenzplasmid pBACOV-SP_{lipB}-*cel8A* (P_{aprE}).

Da P_{xyIA+} und P_{ylb} in LB-S-Medium gute Ergebnisse lieferten, wurde die *cel8A*-Expression unter Kontrolle dieser zwei Promotoren auch in Medium 2 bei 37 °C untersucht. Bei *P. polymyxa* DSM 292 pPxylA+-*cel8A* wurde nach Xyloseinduktion eine Cel8A-Aktivität von 103 \pm 3,26 U/l im Überstand gemessen, während die Aktivität ohne Zugabe von Xylose 34,7 \pm 4,08 U/l betrug. In Medium 2 wurde mit P_{xyIA+} also nur knapp ein

Sechstel der Cel8A-Menge im Vergleich zu LB-S Medium erreicht.

Bei $P_{y/b}$ zeigte der Azo-CMC-Test eine Cel8A-Aktivität von $1\,904 \pm 55,4$ U/l im Überstand (Medium 2). Dieser Wert bewegt sich in der gleichen Größenordnung wie bei der Verwendung von LB-S Medium ($2\,082 \pm 249$ U/l). Dies zeigt, dass mit Medium 2 bei Verwendung des Promotors $P_{y/b}$ keine Produktivitätssteigerung erzielt wurde. Da mit dem Referenzpromotor P_{aprE} in Medium 2 eine Cel8A-Aktivität von $2\,833 \pm 215$ U/l erzielt wurde, lieferte P_{aprE} im Vergleich zu $P_{y/b}$ unter diesen Bedingungen die höhere Ausbeute.

Mit keinem der getesteten Promotoren wurde in Medium 2 eine Steigerung der Cel8A-Produktion erzielt. Um neue, vielversprechende Promotoren zu identifizieren, wurde ein hypothesenbasierter Ansatz verfolgt. Diesem Ansatz zugrunde lag die Überlegung, dass Promotoren, die die Expression von stark sekretierten Wirtsproteinen regulieren, sich auch gut für die sekretorische Produktion heterologer Enzyme eignen sollten.

Um solche stark sekretierten Wirtsproteine zu identifizieren, wurde der Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A}, kultiviert in Medium 2 (24 h, 37 °C, 180 rpm), mit Unterstützung durch BayBioMS (TUM, Freising-Weihenstephan) mittels quantitativer Massenspektrometrie (LC-MS/MS) untersucht. Zur absoluten, markierungsfreien Abschätzung der Proteinabundanz wurde der intensitätsbasierte, absolute Quantifizierungsalgorithmus iBAQ verwendet (Schwanhäusser et al., 2011). Die generierten Daten wurden beim Proteome Xchange Consortium hinterlegt (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>, dataset identifier PXD009882). Eine detaillierte Übersicht der quantitativen Ergebnisse ist als Supplementary Table S2 der Online-Version von Heinze et al. (2018b) beigelegt. Insgesamt wurden 1 078 Proteine mit unterschiedlicher Häufigkeit quantifiziert (Abbildung 26). SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011) prognostizierte bei 60 der identifizierten Proteine ein SP, was als Indiz dafür gewertet werden kann, dass *P. polymyxa* DSM 292 diese Proteine aktiv sekretiert. Aufgrund ihrer hohen Konzentrationen gehörten diese 60 Proteine (offene Kreise in Abbildung 26) zu den 30 % der häufigsten Proteine im Sekretom von *P. polymyxa* DSM 292. Das Genom von *P. polymyxa* DSM 292 beinhaltet insgesamt 418 Gene mit vorausgerechnetem SP (SignalP 4.1, Petersen et al., 2011; Supplementary Table S2 der

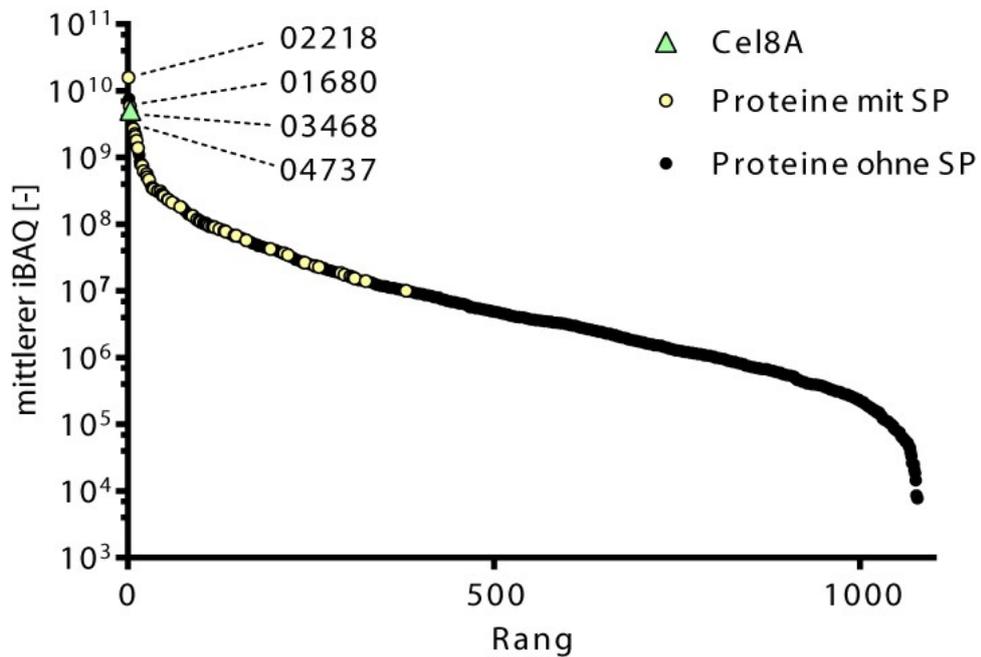


Abbildung 26: Rangdiagramm des Sekretoms von *P. polymyxa* DSM 292. Die Proteine im Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-*cel8A* wurden mittels LC-MS/MS identifiziert und unter Verwendung des intensitätsbasierten, absoluten Quantifizierungsalgorithmus iBAQ quantifiziert (Schwanhäusser et al., 2011). Offene Kreise zeigen die 60 Proteine an, für die ein SP mittels SignalP 4.1 vorhergesagt wurde (Petersen et al., 2011). Diese aktiv sekretierten Proteine gehörten zu den 380 häufigsten Proteinen in der Probe. Das heterologe Zielenzym Cel8A (Dreieck) war das vierthäufigste Protein im Überstand. Die ausgefüllten, schwarzen Kreise zeigen intrazelluläre Proteine an. Die vier häufigsten, sekretierten Wirtsproteine (PPOLYM_02218, PPOLYM_01680, PPOLYM_03468, und PPOLYM_04737) sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Promotoren, welche die Expression der dazugehörigen Gene regulieren, wurden als Kandidaten für die *cel8A*-Expression ausgewählt.

Online-Version von Heinze et al. (2018b)). Dies bedeutet, dass rund 14 % des Repertoires sekretorischer Gene unter den gegebenen Versuchsbedingungen exprimiert wurde. Bei vielen gefundenen Proteinen ohne vorausgerechnetes SP handelt es sich höchstwahrscheinlich um intrazelluläre Proteine. Ihre Anwesenheit lässt sich mit Zellyse während der Kultivierung erklären.

Die sechs häufigsten Proteine im Überstand *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-*cel8A* waren die Wirtsproteine PPOLYM_02218, PPOLYM_00910, PPOLYM_01680, PPOLYM_03468, und PPOLYM_04737 (Tabelle 44) sowie das heterologe Zielenzym Cel8A. Eine Analyse der Proteinsequenzen mit BlastP 2.7.1.+ (Altschul et al., 1997) zeigte, dass PPOLYM_00910 ein Kupfer-Aminoxidase-ähnliches Protein ist, während

PPOLYM_01680 eine konservierte Peptidase_C92 Domäne (pfam05708) besitzt. Bei PPOLYM_04737 handelt es sich um eine Pektatlyase der Familie PL1 Unterfamilie 8 (dbCAN, Yin et al., 2012). Die Sequenzanalyse von PPOLYM_02218 und PPOLYM_03468 ergab keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen. Ein SP wurde für alle genannten Proteine vorausberechnet, mit Ausnahme von PPOLYM_00910 (SignalP 4.1, Petersen et al., 2011). Entsprechend wurden die Promotoren der ORFs PPOLYM_02218, PPOLYM_01680, PPOLYM_03468 und PPOLYM_04737 als geeignete Kandidaten für die Regulation der heterologen *cel8A*-Expression ausgewählt. Die Identifizierung der am stärksten sekretierten Proteine von *P. polymyxa* DSM 292 liefert auch eine Auswahl von effizienten SP-Sequenzen, welche nützlich sein könnten, um die Sekretion heterologer Proteine weiter zu optimieren.

Tabelle 44: Die häufigsten Proteine im Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A}. Der Stamm wurde für 24 h bei 37 °C, 180 rpm in Medium 2 kultiviert. Der Kulturüberstand wurde anschließend mittels LC-MS/MS und unter Verwendung des intensitätsbasierten, absoluten Quantifizierungsalgorithmus iBAQ analysiert (Schwanhäusser et al., 2011). Die angegebenen iBAQ-Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei biologischen Replikaten. Homologe Proteine und/oder konservierte Domänen der *P. polymyxa* DSM 292 Proteine wurden mittels BlastP 2.7.1+ identifiziert (Altschul et al. 1997). Die Vorhersage von SPs wurde mittels SignalP 4.1 durchgeführt (Petersen et al. 2011).

FASTA BEZEICHNUNG	MW [kDA]	BLASTP-ERGEBNIS	MITTLERER iBAQ	SP
02218 hypothetical protein	15,839	Hypothetisches Protein	$1,58 \times 10^{10}$	Ja
00910 hypothetical protein	81,817	Kupfer-Aminoxidase	$7,57 \times 10^9$	Nein
01680 hypothetical protein	26,292	Hypothetisches Protein, konservierte Domäne: Peptidase_C92 pfam05708	$5,89 \times 10^9$	Ja
<i>Cel8A (H. thermocellum)</i>	53,684	<i>Cel8A (H. thermocellum)</i>	$5,14 \times 10^9$	Ja
03468 hypothetical protein	17,155	Hypothetisches Protein	$4,68 \times 10^9$	Ja
04737 pectate lyase A	24,570	Pektatlyase	$2,83 \times 10^9$	Ja

Um P₀₁₆₈₀, P₀₂₂₁₈, P₀₃₄₆₈ und P₀₄₇₃₇ zu untersuchen, wurden Fragmente von 250 – 500 bp *upstream* der jeweiligen kodierenden Sequenzen mittels PCR aus gDNA von *P. polymyxa* DSM 292 vervielfältigt. Der jeweils klonierte Bereich wurde so ausgewählt, dass alle Sequenzabschnitte, die mutmaßlich für die Promotoraktivität benötigt wurden, enthalten waren. Anschließend wurde P_{aprE} des Plasmids pBACOV-SP_{lipB-cel8A} durch die PCR-Produkte der einzelnen Promotoren ersetzt. Zudem wurde für jeden Promotor eine zweite Variante erstellt, bei der zusätzlich zur jeweiligen Promotorsequenz auch das

entsprechende native SP eingefügt wurde. Bei diesen Konstrukten wurden P_{aprE} und SP_{lipB} ersetzt (Tabelle 42).

Tabelle 45 gibt einen Überblick der hypothetischen regulatorischen Elemente in den klonierten Promotorsequenzen. Die RBS wurden manuell identifiziert, indem in einem Bereich von 6 – 11 bp vor dem Startkodon nach Sequenzabschnitten mit Homologie zur *P. polymyxa* Shine-Dalgarno-Sequenz (5' UGGAGA 3') gesucht wurde. Die -35-Elemente und -10-Elemente wurden mittels Bprom vorhergesagt (Solovyev & Salamov, 2011).

Tabelle 45: *In silico*-Sequenzanalyse der klonierten Promotorsequenzen P_{01680} , P_{02218} , P_{03468} und P_{04737} . Die Analyse der -35-Elemente und der -10-Elemente erfolgte mittels Bprom (Solovyev & Salamov, 2011).

PROMOTOR		P_{01680}	P_{02218}	P_{03468}	P_{04737}
Länge		291 nt	409 nt	258 nt	408 nt
-35-Element	Sequenz	TTTAAT	ATGAGG	TTGCTA	TTGAAA
	Abstand vom Startkodon	242 nt	166 nt	124 nt	260 nt
-10-Element	Sequenz	ATCAATAAT	TTTTATATT	ATTTATTAA	GATTATAAT
	Abstand vom Startkodon	217 nt	140 nt	97 nt	238 nt
RBS	Sequenz	AGGAGG	AGGAGA	AGGAGG	GAGAGG
	Abstand vom Startkodon	7 nt	9 nt	8 nt	11 nt
Ursprüngliches Startkodon		GTG	ATG	TTG	ATG

Die Expression des heterologen *cel8A* unter der Kontrolle von P_{01680} , P_{02218} , P_{03468} und P_{04737} in Kombination mit den jeweiligen originalen SP bzw. SP_{lipB} wurde in Medium 2 bei 37 °C untersucht (Abbildung 27). Interessanterweise wurde eine starke SP-Abhängigkeit der Expression für alle Promotoren festgestellt. Während P_{01680} in Kombination mit seinem nativen SP eine 12,5-fach höhere Cel8A-Aktivität als mit SP_{lipB} lieferte, stellte sich bei den anderen drei Promotoren SP_{lipB} als das produktivere SP heraus. Bei P_{02218} und P_{04737} war die Cel8A-Aktivität mit SP_{lipB} 2,7-mal höher als mit SP_{02218} bzw. SP_{04737} . Bei P_{03468} lieferte die Kombination mit SP_{lipB} sogar einen 8,1-mal höheren Wert als SP_{03468} . Die höchsten Cel8A-Aktivitäten lieferten P_{01680} - SP_{01680} und P_{03468} - SP_{lipB} . Mit

P_{01680} - SP_{01680} wurde eine $Cel8A$ -Aktivität von $2\,660 \pm 245$ U/l gemessen, was ein ähnliches Ergebnis wie mit P_{aprE} - SP_{lipB} ist. Das beste Ergebnis erzielte die Kombination P_{03468} - SP_{lipB} , mit einer spezifischen Aktivität von $5\,475 \pm 411$ U/l, was eine Erhöhung um 93 % im Vergleich zur Referenz P_{aprE} - SP_{lipB} ($2\,883 \pm 215$ U/l) darstellt.

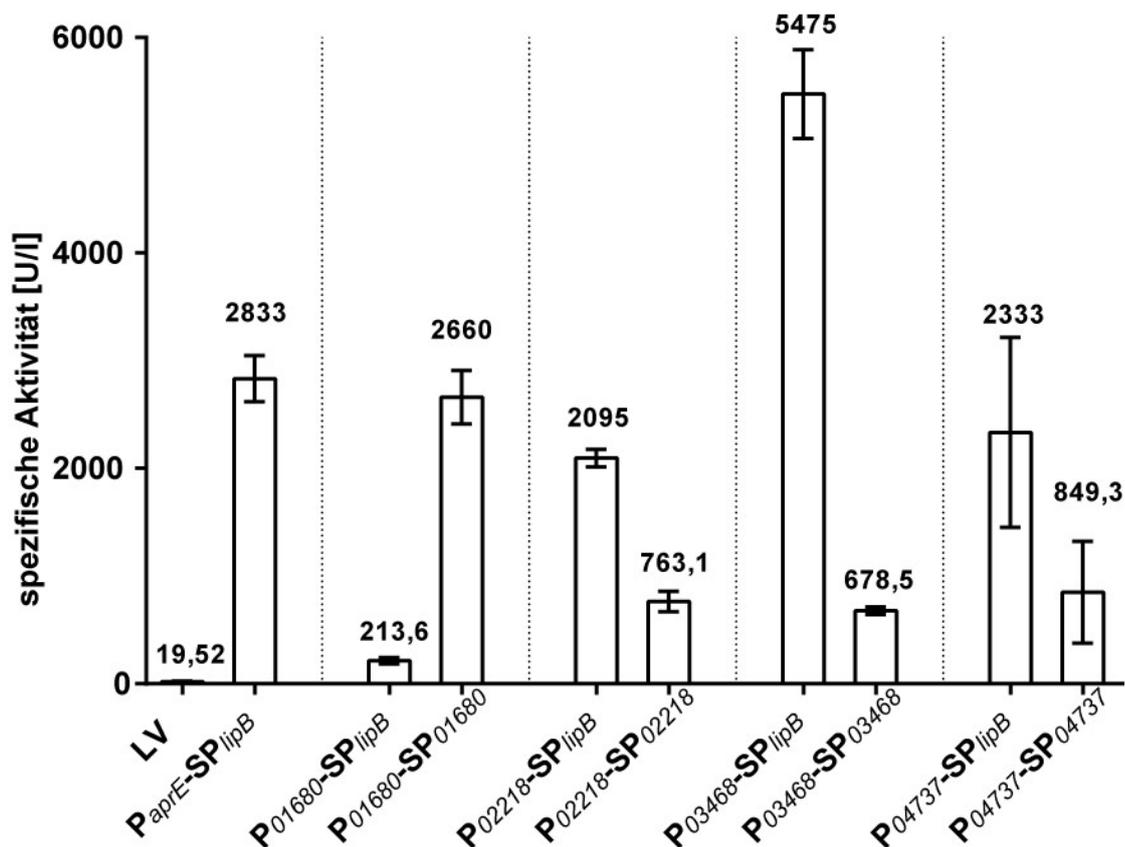


Abbildung 27: Einfluss ausgewählter Promotorsequenzen und SP auf die heterologe *cel8A*-Expression in *P. polymyxa* DSM 292. Die Promotorsequenzen wurden von den Genen der am stärksten sekretierten Wirtsproteine von *P. polymyxa* DSM 292 abgeleitet (vgl. Abbildung 26 sowie Tabelle 44). *P. polymyxa* DSM 292 Klone mit pP01680- SP_{lipB} -*cel8A*, pP01680- SP_{nat} -*cel8A*, pP02218- SP_{lipB} -*cel8A*, pP02218- SP_{nat} -*cel8A*, pP03468- SP_{lipB} -*cel8A*, pP03468- SP_{nat} -*cel8A*, pP04737- SP_{lipB} -*cel8A* oder pP04737- SP_{nat} -*cel8A* wurden für 24 h bei 37 °C, 180 rpm in Medium 2 inkubiert, anschließend wurde die CMC-Case-Aktivität im Überstand mit dem Azocase-Test gemessen. LV: Negativkontrollstamm mit pBACOV (Leervektor). Die Balken zeigen den Mittelwert aus jeweils drei biologischen Replikaten (Ausnahme: pP03468- SP_{lipB} -*cel8A*: zwei Replikate), jeweils in Dreifachbestimmung gemessen, \pm Standardabweichung.

3.2.8 Enzymproduktion im Bioreaktor

Im industriellen Maßstab erfolgt die Enzymproduktion in Bioreaktoren. Um eine erste Aussage über die kommerzielle Anwendbarkeit von *P. polymyxa* DSM 292 treffen zu können, wurde das Verhalten des Wirts im Bioreaktor untersucht. Dafür wurde zunächst ein Versuch im Satzverfahren (1-Liter-Maßstab) und anschließend ein Versuch im Zulaufverfahren (10-Liter-Maßstab) durchgeführt.

Die Fermentation im Satzverfahren wurde mit *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} in Medium 0 (siehe Kapitel 3.2.6) durchgeführt (siehe Kapitel 2.9). Nach 18 h, 24 h und 42 h wurden Probenaliquots entnommen, um die Zelldichte (OD₆₀₀) und die Zielproteinkonzentration (über Azo-CMC-Aktivitätsassay) zu messen (Tabelle 46). Die höchste Zelldichte und Cel8A-Aktivität wurde am Ende der Fermentation (t = 42 h) erreicht.

Tabelle 46: Zelldichte (OD₆₀₀) und Cel8A-Aktivität (Azo-CMC) zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation im Satzverfahren mit *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} in Medium 0.

	FERMENTATIONSDAUER		
	18 h	24 h	42 h
OD ₆₀₀	6,7	5,5	8,6
Cel8A-Aktivität (U/l)	580	619	1158

Der Kesselinhalt wurde nach einer Gesamtfermentationszeit von 42 h geerntet. Nach einer ersten Zentrifugation für 10 min bei 4 500 g und 4 °C war kein Zellpellet vorhanden. Es zeigte sich, dass während der Fermentation erhebliche Mengen Schleim entstanden waren, der die Zellen in der Schwebe hielt und die Pelletierung verhinderte. Um trotzdem klaren Kulturüberstand für weitere Untersuchungen gewinnen zu können, wurde der Kesselinhalt erneut zentrifugiert (30 min bei 30 000 g, 4 °C) und anschließend membranfiltriert. Im ersten Schritt wurden Filter mit einem Porendurchmesser von 0,8 µm verwendet, dann wurde das Filtrat erneut mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert. So konnten 650 ml Kulturüberstand gewonnen werden. Dieser wurde in zwei Schritten mittels FPLC auf ein 5 ml His-Trap FF Säulchen aufgetragen, um das enthaltene Zielprotein mittels IMAC zu reinigen (siehe Kapitel 3.2.4). Die Elution

erfolgte wiederum über einen Stufengradienten mit 50 % bzw. 100 % Elutionspuffer. Ab Beginn der ersten Elutionsstufe wurden Fraktionen à 1 ml gesammelt (Abbildung 28). So konnten 4,8 mg Cel8A gereinigt werden (gemessen mittels Bradford), was einer Ausbeute von 7,4 mg/l und 10 % des Gesamtgehaltes an Cel8A entspricht.

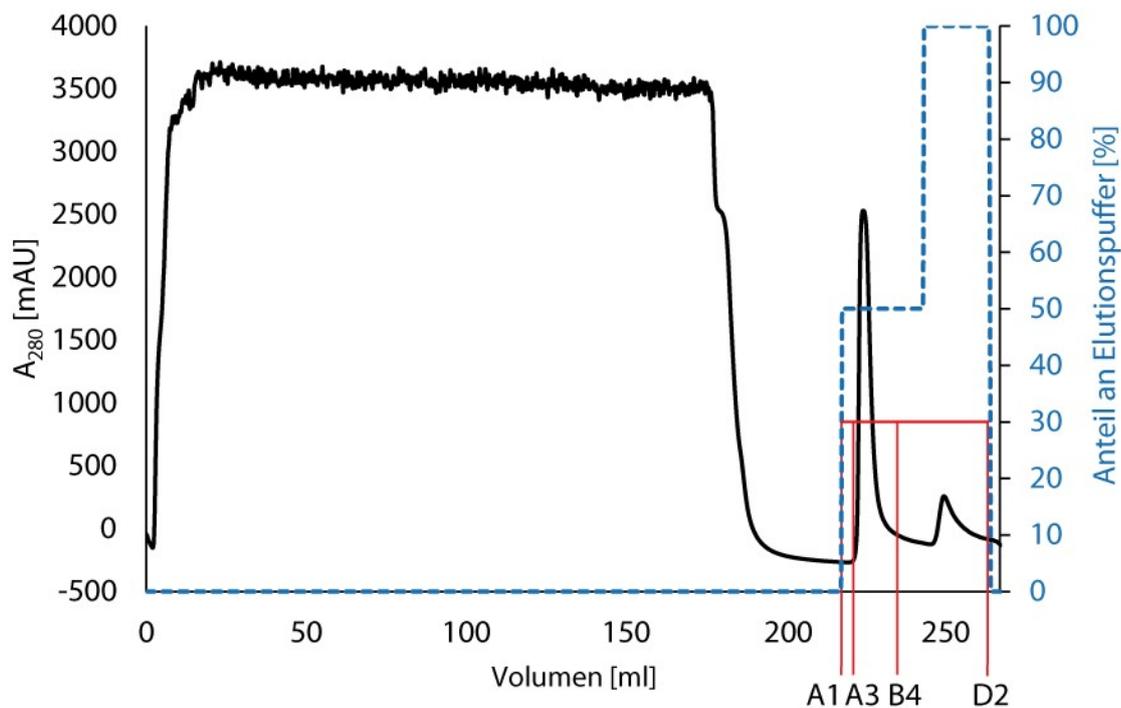


Abbildung 28: Chromatogramm der Reinigung von Cel8A mittels IMAC aus 650 ml zellfreiem Kulturüberstand der Fermentation im Satzverfahren. Der Überstand wurde in zwei Schritten auf das 5 ml His-Trap FF Säulchen aufgetragen, dargestellt ist nur der zweite Schritt. A1, D2: erste und letzte gesammelte Fraktion. Die Fraktionen A3 bis B4 wurden für die weitere Untersuchung vereinigt.

Die gesammelten Fraktionen und weitere Zwischenstufen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot (α -His₆-Antikörper-AP) untersucht (Abbildung 29). Dies zeigte lediglich eine schwache Bande auf der erwarteten Höhe bei den vereinigten Eluatsfraktionen sowie mehrere Banden über und unter der erwarteten Höhe. Somit war die Isolierung von reinem Cel8A aus dem Fermenterüberstand nicht erfolgreich. Mögliche Gründe hierfür dürften zum einen die Schwierigkeiten bei der Gewinnung des zellfreien Kulturüberstandes sowie ein Abbau des Zielproteins bzw. des C-terminalen His₆-tags durch Wirtsproteasen gewesen sein.

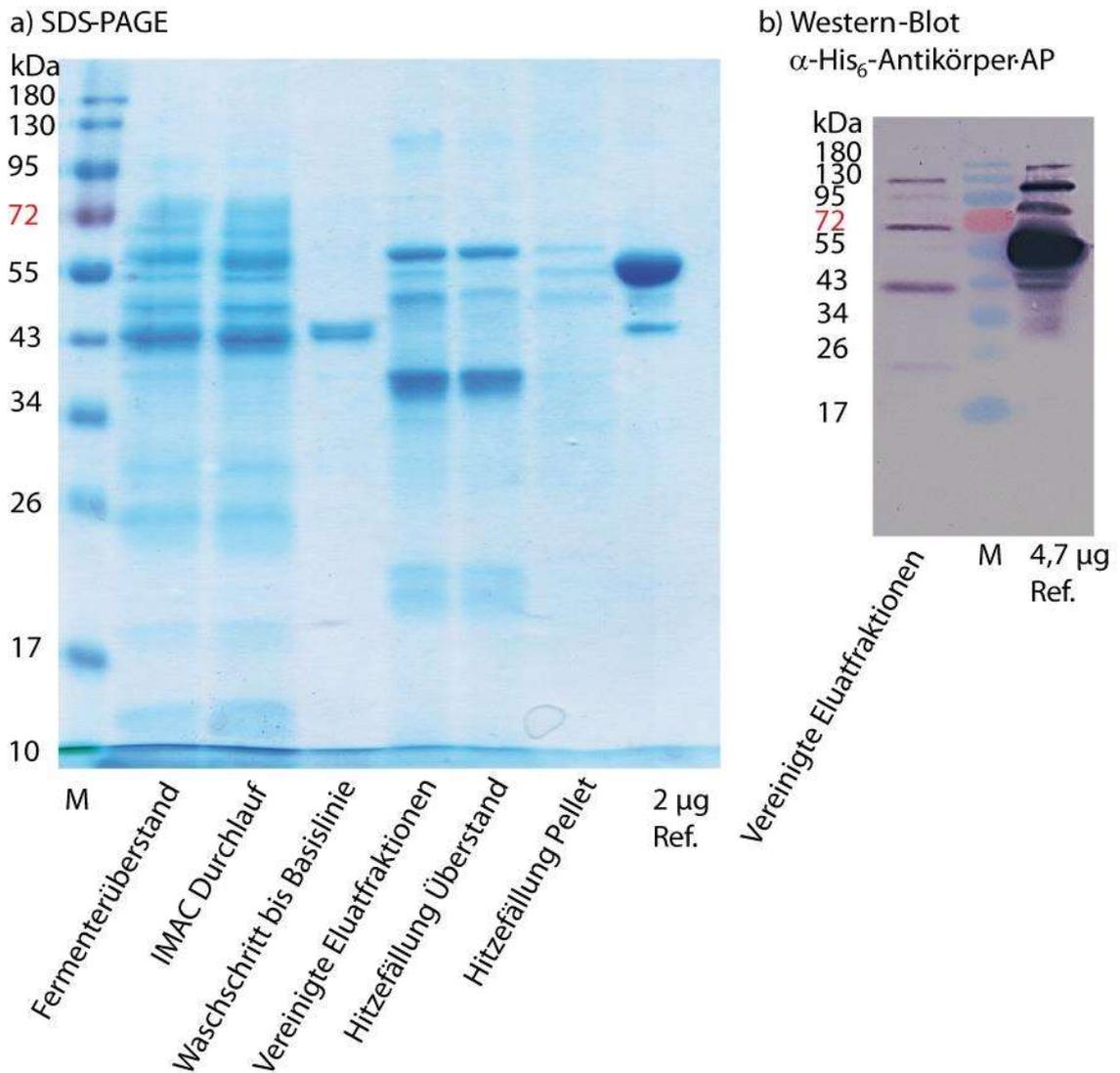


Abbildung 29: Untersuchung verschiedener Proben der Reinigung von Cel8A aus dem Fermenterüberstand per **a)** SDS-PAGE und **b)** Western-Blot (α -His₆-Antikörper-AP). M: PageRuler Prestained, Ref: Cel8A produziert in *E. coli*. Die Vereinigung der Eluatfraktionen der IMAC-Reinigung (Abbildung 28) wurde zusätzlich per Hitzefällung behandelt und der Überstand und das Pellet auf die SDS-PAGE aufgetragen. Die SDS-PAGE lässt bei den vereinigten Eluatfraktionen eine schwache Bande auf Höhe des Referenz-Cel8A erkennen. Darüber hinaus sind sowohl in Western-Blot als auch in der SDS-PAGE nur Banden zu erkennen, die entweder auf Aggregation (apparentes Molekulargewicht > Referenz) oder Abbau (apparentes Molekulargewicht < Referenz) hindeuten.

Die Schleimbildung und die Produktion von Wirtsproteasen stellten somit die größten Hürden für die sekretorische Cel8A-Produktion mit *P. polymyxa* DSM 292 im Bioreaktor dar. Bei dem gebildeten Schleim handelt es sich um Exopolysaccharide (EPS), die

P. polymyxa aus Glucose oder anderen C-Quellen bilden kann (Rütering et al., 2017, 2016). Die EPS-Bildung lässt sich durch die Prozessbedingungen nicht unterdrücken, sofern das Medium eine beliebige Zuckerart oder Glycerin als C-Quelle enthält (Rütering et al., 2017, 2016). Entsprechend wurde versucht, durch gezieltes Ausschalten einzelner Gene die EPS-Bildung zu verhindern (siehe dazu Kapitel 3.2.9).

Im Gegensatz zur EPS-Bildung kann die Produktion von Wirtsproteasen durch die Medienzusammensetzung beeinflusst werden. So zeigten Fogarty & Griffin (1973), dass bei Verwendung von 10 g/l Pepton die Produktion einer extrazellulären Metalloprotease von *P. polymyxa* 3,5-mal höher ist als mit 10 g/l Hefeextrakt. Um die Produktion von Wirtsproteasen einzudämmen, wurde deshalb für weitere Fermentationsversuche Hefeextrakt statt Sojapepton als komplexer Medienbestandteil ausgewählt.

Im folgenden Versuch wurde der produktivste Stamm, *P. polymyxa* DSM 292 pP03468-SP_{lipB-cel8A}, in Medium 2 mit Hefeextrakt im Zulaufverfahren im 10 l-Maßstab untersucht (siehe Kapitel 2.9 und Tabelle 28). Da die Erzeugung einer EPS-defizienten Mutante nicht erfolgreich war (siehe Kapitel 3.2.9), war in diesem Versuch wiederum mit der Produktion von EPS zu rechnen. Ziel war also nicht die Reinigung einer möglichst großen Menge an Cel8A, sondern der Erkenntnisgewinn zur Maßstabsvergrößerung und zum Verhalten des Produktionsstammes unter den gegebenen Bedingungen. Zudem sollte die Ausbeute und Stabilität von Cel8A abgeschätzt werden.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus dem Fermenter entnommen, um das Wachstum der Kultur (OD₆₀₀) und die Cel8A-Aktivität (mittels Azo-CMC-Aktivitätsassay) zu messen (Tabelle 47). Die erreichte Zelldichte war zu den jeweiligen Zeitpunkten im Zulaufverfahren etwa doppelt so hoch wie im Satzverfahren (Tabelle 46). Hingegen nahm die Cel8A-Aktivität nicht proportional zu. In den ersten 24 h war sie ca. 1,3 bis 1,4-fach höher als im Satzverfahren, wohingegen sie gegen Ende der Fermentation (42 h – 44,5 h) deutlich abnahm.

Tabelle 47: Zelldichte (OD₆₀₀) und Cel8A-Aktivität (Azo-CMC) zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation im Zulaufverfahren mit *P. polymyxa* DSM 292 pP03468-SP_{lipB}-cel8A, in Medium 2 mit Hefeextrakt (10 l-Maßstab). Die angegebene Cel8A-Aktivität ist jeweils der Mittelwert einer Dreifachbestimmung ± Standardabweichung.

	FERMENTATIONSDAUER							
	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h	40 h	42 h	44,5 h
OD ₆₀₀	13,0	14,3	14,8	13,6	14,4	15,1	15,5	14,9
Cel8A-Aktivität [U/l]	750 ± 34	775 ± 16	681 ± 72	650 ± 67	888 ± 47	943 ± 52	675 ± 18	526 ± 82

Nach Ende der Fermentation wurden 40 ml zellfreier Kulturüberstand durch Zentrifugation und Membranfiltration gewonnen. Um das Zieprotein mittels IMAC zu reinigen, wurde der Überstand mittels FPLC (Pharmacia LKB) auf eine 1 ml HisTrap FF crude Säule aufgetragen. Das gesammelte Eluat enthielt 2,1 mg Cel8A, was einer Ausbeute von 52,5 mg/l entspricht.

Das aus dem Fermentationsüberstand gereinigte Cel8A wurde hinsichtlich Reinheit und Komplexbildung mit CipA6.2 untersucht. Per SDS-PAGE wurden neben geringen Verunreinigungen durch Wirtsproteine jedoch auch starke Hinweise auf proteolytischen Abbau des Zielproteins gefunden. Direkt unterhalb der Bande auf der erwarteten Höhe von Cel8A (50 kDa) waren Abbaubanden zu erkennen. Der Nachweis mit dem α -Cel8A Antikörper lieferte ein eindeutiges Signal sowohl für das Zielprotein, als auch für die Abbauprodukte. Einen weiteren Hinweis auf proteolytischen Abbau des Zielproteins lieferte der Versuch zur Komplexbildung mit CipA6.2. Während die Positivkontrolle mit Referenz-CelA aus *E. coli* einen Komplex mit CipA6.2 bildete, war dies für die aus dem Fermenter gereinigte Probe nicht nachweisbar. Als Fazit ist festzuhalten, dass das gebildete EPS sowie die Wirtsproteasen die Reinigung von funktionalem Volllängen-Zielprotein stark erschweren.

3.2.9 Gezielte Gendeletion

Die Versuche im Bioreaktor zeigten, dass sich weder die Bildung von EPS noch von Wirtsproteasen effektiv durch die gewählten Prozessparameter unterbinden ließen. Das gezielte Ausschalten einzelner Gene war jedoch ein möglicher Ansatz, um *P. polymyxa* DSM 292 dennoch zu einem Produktionsorganismus weiterzuentwickeln, der für die

Anwendung im Bioreaktor geeignet wäre. Zunächst wurden geeignete Zielgene für die Deletion definiert (Tabelle 48).

Tabelle 48: Auswahl der Zielgene für die gezielte Gendeletion

ZIELGEN	BESCHREIBUNG	ERWARTETER PHÄNOTYP
<i>pepC</i>	Glycosyltransferase zur Initiation der EPS-Produktion	Verminderte Schleimbildung
<i>pepQ</i>	Glycosyltransferase zur Initiation der EPS-Produktion	Verminderte Schleimbildung
<i>npr2</i>	Putative Hauptprotease in <i>P. polymyxa</i> DSM292 („Bacillolysin“)	Verminderte Proteaseaktivität
<i>npr1 + npr2</i>	<i>npr1</i> : weiteres Protease-Gen, bildet mit <i>npr2</i> ein Operon.	Verminderte Proteaseaktivität
<i>spo0A</i>	Transkriptionsregulator, Initiation der Sporulation	Sporulationsdefizienz
<i>spoIV</i>	Protein des Sporen-Kortex	Sporulationsdefizienz
<i>sigF2</i>	Wichtiger Sigma-Faktor in der sich entwickelnden Spore	Sporulationsdefizienz

Für die Deletionen, insbesondere der EPS-Gene, wurde eng mit Christoph Schilling (Lehrstuhl für Chemie biogener Rohstoffe, Prof. Sieber, TUM) zusammengearbeitet. Basierend auf deren Arbeit zur Produktion maßgeschneiderter Exopolysaccharide in *P. polymyxa* DSM 365 (Rütering et al., 2017) wurden *pepC* und *pepQ* als Zielgene für einen Stamm mit reduzierter EPS-Produktion ausgewählt. PepC und PepQ sind vermutlich redundante Glycosyltransferasen, welche die EPS-Produktion initiieren. So produzierte *P. polymyxa* DSM 365 $\Delta pepC$ nach Rütering et al. (2017) nur ca. 18 % der EPS-Menge im Vergleich zum Wildtyp. Die $\Delta pepC$ - $\Delta pepQ$ -Doppelmutante produziert laut Christoph Schilling kein EPS mehr (persönliche Kommunikation).

Anhand der in dieser Arbeit ermittelten Genomsequenz von *P. polymyxa* DSM 292 ließen sich über 70 potenzielle Protease- bzw. Peptidasegene identifizieren, wobei ca. 12 % dieser Sequenzen eine Signalpeptid-kodierende Region am 5'-Ende aufwiesen. Die Daten der MS-Untersuchung des Kulturüberstandes (Kapitel 3.2.7) zeigten die von *npr2* kodierte neutrale Metalloprotease Bacillolysin auf Rang 29 der häufigsten Proteine im Überstand. Somit war Bacillolysin die mit Abstand häufigste Protease im Überstand. Dies deckt sich mit den Literaturangaben, wonach Bacillolysin („Gentlyase“) die Hauptprotease von *P. polymyxa* ist (Fogarty & Griffin, 1973; Griffin & Fogarty, 1973;

Ruf et al., 2013). Aufgrund dieser Fakten wurde *npr2* als lohnendes Zielgen für eine Mutante mit verringerter Proteaseaktivität ausgewählt. Da *npr2* in einem Operon mit *npr1* liegt, sollte zudem versucht werden, beide Gene gemeinsam auszuschalten.

Neben Mutanten mit verringerter Proteaseaktivität bzw. EPS-Bildung sollte zudem auch ein sporulationsnegativer Stamm erzeugt werden. Sporulationsdefiziente Stämme bieten in der Fermentation nicht nur Vorteile bei der Sterilisierung des Bioreaktors und der biologischen Sicherheit (keine Verbreitung von Sporen), sondern können auch eine erhöhte Enzymproduktion aufweisen (Ara et al., 2007). Entsprechend wurden *spo0A*, *spoIV* und *sigF2* als Zielgene für eine mögliche sporulationsdefiziente Mutante ausgewählt. Der Transkriptionsfaktor Spo0A ist von zentraler Bedeutung für den Übergang von der vegetativen Zelle zum Beginn der Sporulation (Errington, 1993). Zudem führte eine spontante Punktmutation im *spo0A*-Gen bei *P. polymyxa* SC2 zu einem sporulationsdefizienten Phänotyp (Hou et al., 2016). Das *spoIV*-Gen spielt für die korrekte Bildung des Sporen-Kortex eine wichtige Rolle; in *B. licheniformis* und *B. megaterium* führte die Deletion des *spoIV*-Gen zu Sporulationsdefizienz (Nahrstedt et al., 2005; Wittchen et al., 1998). Das *sigF*-Gen kodiert für den Sigma-Factor σ^F , welcher kompartimentspezifisch in der Vorspore aktiv ist und dort die Transkription von ca. 50 Genen reguliert (de Hoon et al., 2010). Zudem zeigten Ara et al. (2007) eine um 180 % erhöhte sekretorische Cellulaseproduktion einer *B. subtilis sigF*-Mutante im Vergleich zu *B. subtilis* 168.

Die Deletion der ausgewählten Zielgene sollte mittels des CRISPR/Cas9-Systems pCasPP von Rütering et al. (2017) erfolgen. Dazu wurden vom Lehrstuhl für Chemie biogener Rohstoffe (TUM) sowohl der pCasPP-Leervektor als auch die fertigen Plasmide pCasPP-*pepC* und pCasPP-*pepQ* zur Verfügung gestellt. Ausgehend von pCasPP wurden für die Zielgene *spo0A*, *spoIV*, *sigF2*, *npr2* und *npr1+2* jeweils zwei Knockout-Plasmide mit unterschiedlichen sgRNAs erfolgreich erstellt (siehe Kapitel 2.6.9). Eine beispielhafte Plasmidkarte (pCasPP-*sg1-spo0A*) ist in Abbildung 30 dargestellt.

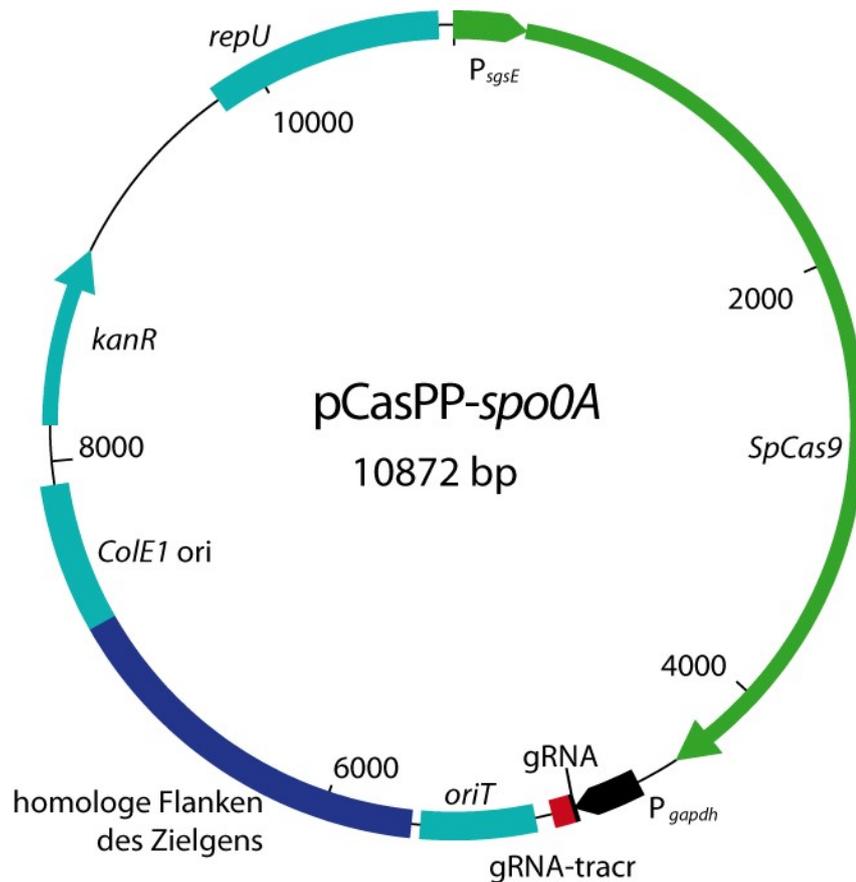


Abbildung 30: Plasmidkarte des Plasmids pCasPP-sg1-*spo0A*. Die pCasPP-Plasmide für die Deletion der anderen Zielgene sind analog aufgebaut und unterscheiden sich nur anhand der homologen Flanken und der gRNA-Sequenz (*guide-RNA*), welche für jedes Zielgen individuell designiert wurden.

Die Protospacer-Sequenzen wurden anhand der folgenden fünf Kriterien ausgewählt:

- 1) Sequenzen mit vier Purin-Basen (A, G) am 3'-Ende des Protospacers
- 2) Sequenzen auf dem nicht-kodierenden Strang
- 3) Sequenzen, in denen die letzten 12 nt des Protospacers (*seed*-Region) plus die 3 nt des PAM (NGG) im Genom nur einmal vorkommen
- 4) Sequenzen in der Nähe des Anfangs bzw. Endes der Zielsequenz
- 5) Sequenzen mit mindestens zwei Nichtübereinstimmungen in der *seed*-Region an allen möglichen unspezifischen Zielsequenzen (*off-targets*).

Die Kriterien 1-3 wurden anhand von Cobb et al. (2015) festgelegt. Kriterium 4 wurde aufgrund von Empfehlungen von C. Schilling festgelegt (persönliche Kommunikation), und Kriterium 5 anhand (Hsu et al., 2013). Die Berechnungen zur Überprüfung der

Kriterien 3 und 5 wurden mit CasOT (Xiao et al., 2014) durchgeführt und sind in Anhang A3 näher erläutert.

Das Prinzip der Gendeletion mittels CRISPR/Cas9 ist in Abbildung 31 dargestellt. Auf dem pCasPP-Plasmid befinden sich das *SpCas9*-Gen, die kodierende Sequenz für die sgRNA und Flanken für die homologe Rekombination. Die vom *SpCas9*-Gen kodierte Nuklease Cas9 (Cobb et al., 2015) ist als Apoenzym nicht aktiv. Erst in Verbindung mit der sgRNA (*single guide RNA*) erhält Cas9 die sequenzspezifische Nukleaseaktivität und kann einen Doppelstrangbruch in der Zielsequenz erzeugen. Die sgRNA enthält die eigentliche gRNA (*guide RNA* oder *spacer* genannt), welche die Sequenzspezifität liefert. Die *protospacer* genannte Zielsequenz ist eine beliebige Sequenz mit einer Länge von 20 nt. Der Protospacer muss lediglich die Voraussetzung erfüllen, dass er unmittelbar an das sogenannte *protospacer adjacent motif* (PAM) angrenzt. Im Falle der hier verwendeten Cas9-Nuclease hat das PAM die Sequenz 5' NGG 3' (N = beliebiges Nucleotid). Das PAM ist zwingend für die Erkennung und Spaltung der Zielsequenz durch Cas9 erforderlich. In der sgRNA ist der *spacer* über ein kurzes Verbindungsstück mit der *tracrRNA* (*trans-activating crRNA*) verbunden, welche die Aufnahme der sgRNA in das Cas9-Apoenzym ermöglicht. Bei den Flanken handelt es sich um DNA-Segmente von ca. 1 kb Länge, die im Genom das zu entfernende Gen einrahmen. Die obere und untere Flanke werden nahtlos aneinandergesetzt und ermöglichen so die homologe Rekombination zwischen (geschnittenem) Genom und dem Plasmid. So kann die Zelle den lethalen Doppelstrangbruch des Genoms reparieren, wobei das Zielgen deletiert wird. (Cobb et al., 2015; Mougiakos et al., 2016; Rütering et al., 2016).

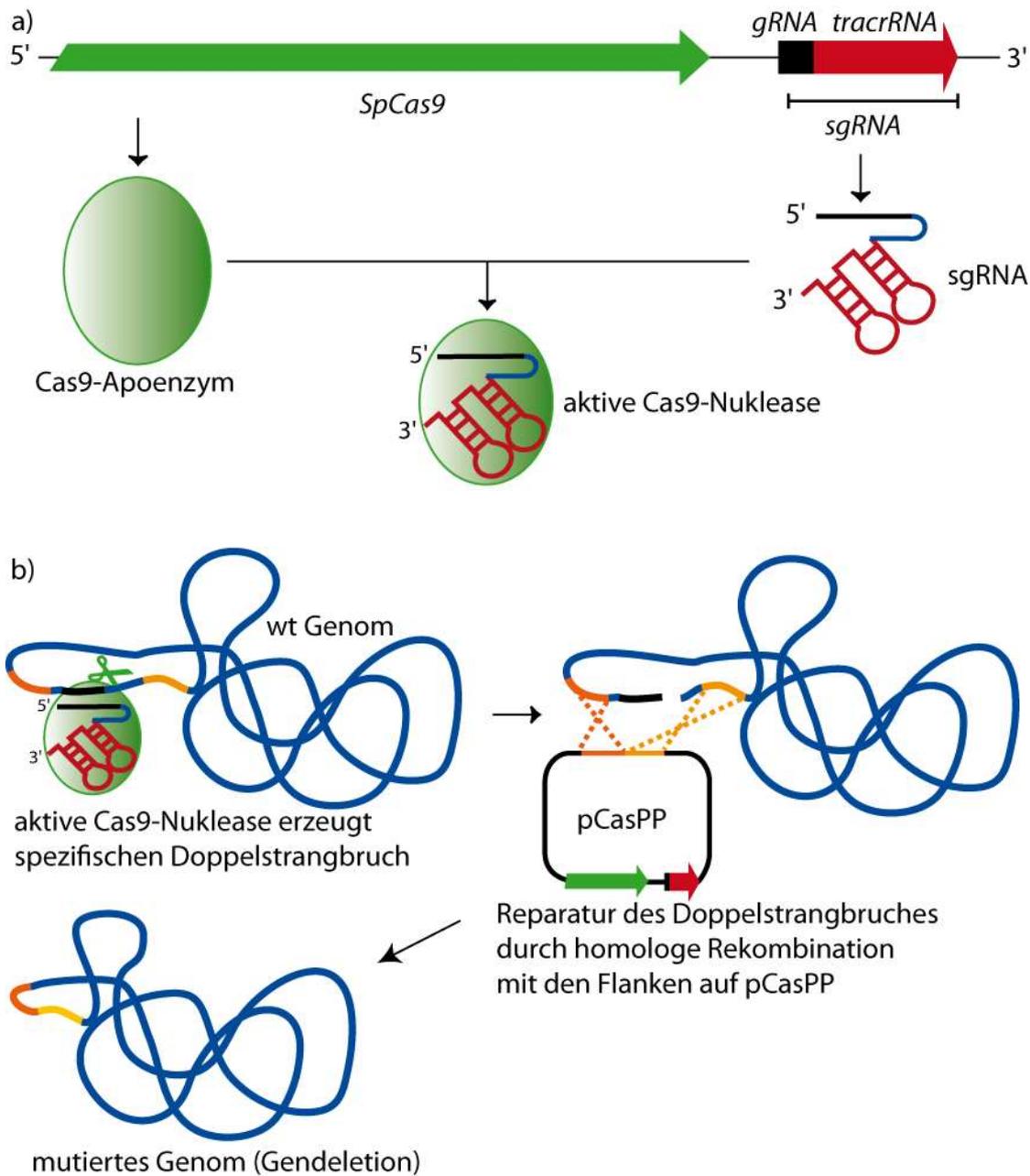


Abbildung 31: Prinzip der gezielten Gendeletion mittels CRISPR/Cas9. a) *spCas9* (grün) und *sgRNA* (schwarz-rot) werden vom Plasmid pCasPP exprimiert. Durch Einlagerung der *sgRNA* in das Cas9-Apoenzym entsteht die sequenzspezifische, aktive Cas9-Nuclease (Cas9-*sgRNA*-Komplex). b) Die aktive Cas9-Nuclease erzeugt einen Doppelstrangbruch in der Zielsequenz (schwarz). Durch homologe Rekombination über die homologen Flanken auf dem pCasPP-Plasmid (orange) wird der Doppelstrangbruch repariert und gleichzeitig das Zielgen (zwischen den Flanken) entfernt. Das Resultat ist das mutierte Genom, aus welchem das Zielgen deletiert wurde.

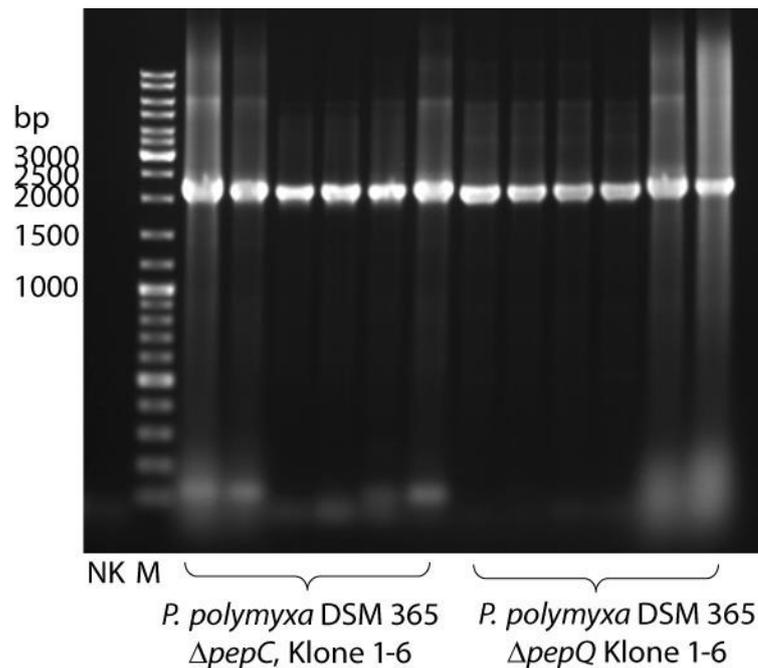


Abbildung 32: Agarosegel (1,4 %) der analytischen PCR zum Nachweis der Deletionen von *pepC* und *pepQ* in Kolonien von *P. polymyxa* DSM 365. Die Gene wurden mittels pCasPP-*pepC* bzw. pCasPP-*pepQ* gezielt entfernt. Verwendete Primer: $\Delta pepC$: DSM365_PepC_17389fw und CheckSeq5_299405fw, $\Delta pepQ$: CheckSeq5_280822rv und DSM365_PepQ_41406_rv. Bei allen getesteten Kolonien entsprachen die Banden den für die Mutanten erwarteten Größen von 2121 bp ($\Delta pepC$) bzw. 2064 bp ($\Delta pepQ$). NK: Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne Zellmaterial), M: Marker, GeneRuler Mix.

Die fertigen pCasPP-Plasmide wurden mittels triparentaler Konjugation in *P. polymyxa* DSM 292 übertragen. Als Kontrollen wurden pCasPP-*pepC* und pCasPP-*pepQ* auch in *P. polymyxa* DSM 36^T und dem von Rütering et al. (2017) verwendeten Stamm *P. polymyxa* DSM 365 übertragen. Es stellte sich heraus, dass die Erhöhung der Kan-Konzentration im Selektionsagar von 10 mg/l auf 50 mg/l sowie eine längere Inkubation der Selektionsplatten essenziell für erfolgreiche Deletionen waren. Die erhaltenen Klone wurden mittels analytischer PCR auf Gendeletionen untersucht. Bei *P. polymyxa* DSM 292 konnten für keines der sieben Zielgene Mutanten festgestellt werden. Bei *P. polymyxa* DSM 365 wiesen alle getesteten Klone (sechs je Konstrukt) die Deletion von *pepC* bzw. *pepQ* auf (Abbildung 32). Die erwarteten Banden lagen bei 2121 bp ($\Delta pepC$) bzw. 2064 bp ($\Delta pepQ$), wohingegen die Wildtypbanden Größen von 2820 bp bzw. 2643 bp aufgewiesen hätten. Zudem konnte auch bei *P. polymyxa* DSM 36^T eine Mutantenkolonie nachgewiesen werden (zwölf getestete Kolonien).

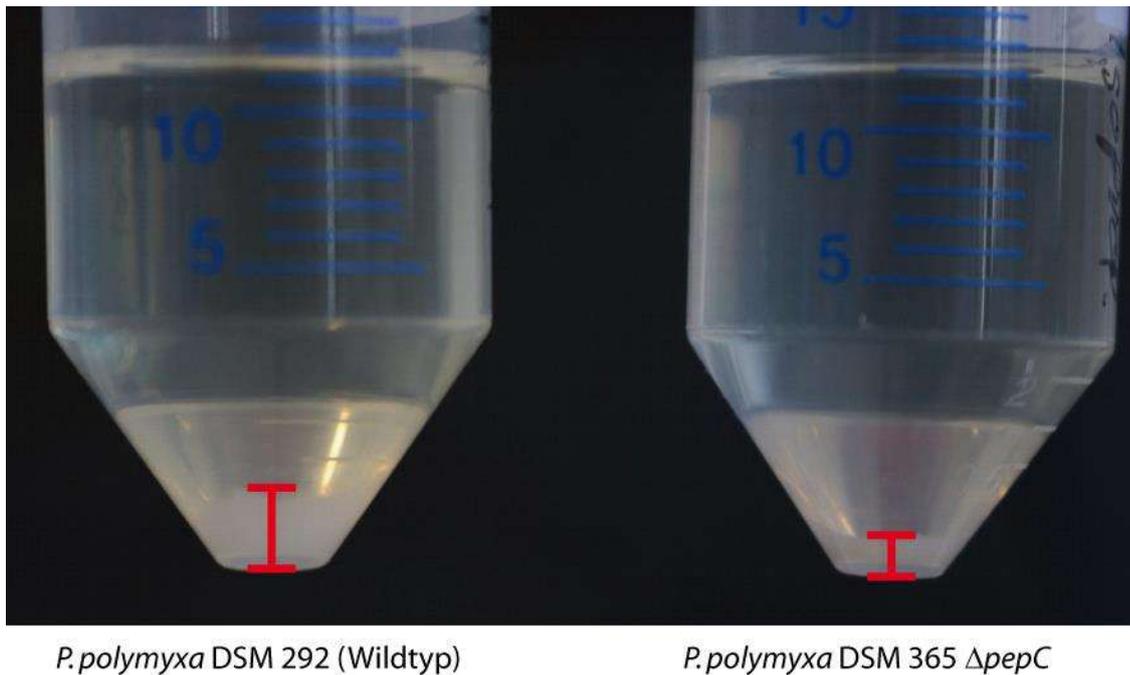


Abbildung 33: Vergleich der EPS-Produktion von *P. polymyxa* DSM 292 und *P. polymyxa* DSM 365 $\Delta pepC$. Beide Stämme wurden für 24 h bei 37 °C, 180 rpm in Medium 2 inkubiert. Nach Präzipitation des Kulturüberstandes mit zwei Volumina Isopropanol wurde bei *P. polymyxa* DSM 292 ein deutlich größeres EPS-Pellet sichtbar als bei *P. polymyxa* DSM365 $\Delta pepC$. Die roten Balken zeigen die Höhe der gewonnenen EPS-Pellets an.

Um den Effekt der $\Delta pepC$ -Mutation auf die EPS-Produktion in Medium 2 abschätzen zu können, wurden *P. polymyxa* DSM 292 und *P. polymyxa* DSM 365 $\Delta pepC$ für 24 h bei 37 °C, 180 rpm in Medium 2 inkubiert. Anschließend wurden jeweils 4 ml Kulturüberstand mit 8 ml Isopropanol gemischt, um das gebildete EPS zu fällen. Nach dem Absetzen wurden die Präzipitate beider Kulturen optisch verglichen. Dabei war bei DSM 365 $\Delta pepC$ ein deutlich kleineres Pellet sichtbar. Somit konnte eine erfolgreiche Verringerung der Schleimbildung durch gezieltes Ausschalten des *pepC*-Gens gezeigt werden, wenngleich ein zusätzlicher Vergleich mit *P. polymyxa* DSM 365 (Wildtyp) eine klarere Aussage ermöglicht hätte. Trotz der geringeren Schleimbildung stellt *P. polymyxa* DSM 365 $\Delta pepC$ jedoch keine gleichwertige Alternative zu *P. polymyxa* DSM 292 für die Enzymproduktion dar. In einem Versuch zur *cel8A*-Expression betrug die CMC-Case-Aktivität im Kulturüberstand von *P. polymyxa* DSM 365 $\Delta pepC$ pP3468-SP_{lipB}-*cel8A* nur ca. 5 % der Aktivität von DSM292 mit demselben Expressionsplasmid.

4. DISKUSSION

4.1 Übertragung von pBACOV in Bazillen

pBACOV wurde mittels des hier verwendeten Protokolls zur triparentalen Konjugation erfolgreich in 16 verschiedene Bakterienstämme der Klasse Bacilli übertragen. Die Anwendbarkeit von pBACOV in Vertretern der Gattungen Bacillus, Paenibacillus, Lactobacillus und Lactococcus wurde gezeigt. pBACOV kann nicht nur in eine Vielzahl verschiedener Wirte übertragen werden, auch die Expressionskassette von pBACOV erwies sich als vielseitig einsetzbar: in acht von neun getesteten Stämmen war die Expression von sfGFP nachweisbar. Somit steht mit pBACOV ein universell einsetzbares und leicht übertragbares Expressionsplasmid für die biotechnologische Anwendung in Bazillen zur Verfügung.

Die Übertragung von Plasmid-DNA von Gram-negativen *E. coli*-Donoren auf Gram-positive Akzeptorstämme mittels Konjugation wurde bereits früher beschrieben (Rachinger et al., 2013; Schäfer et al., 1990; Soutschek-Bauer & Staudenbauer, 1987). Beispielsweise zeigen Studien den Plasmidtransfer auf *B. licheniformis*, *B. subtilis* und thermophile *Bacillus*-Stämme, sowie *Clostridium acetobutylicum* (Hertel et al., 2015; Rachinger et al., 2013; Soutschek-Bauer & Staudenbauer, 1987; Tominaga et al., 2016; Young et al., 1989). Während sich die meisten Arbeiten zum Plasmidtransfer auf einzelne Akzeptorstämme konzentrieren, fehlen Untersuchungen zur Vielseitigkeit dieser Methode für den Gentransfer auf verschiedenste Arten mesophiler Bazillen. Das in dieser Arbeit entwickelte Plasmid pBACOV ist ein Vektor mit breitem Wirtsspektrum, der einfach in einen gewünschten Akzeptorstamm übertragen werden kann. Für die dafür verwendete Methode der triparentalen Konjugation wurde der englische Begriff *transmating* geprägt (Heinze et al., 2018a).

Um die Vielseitigkeit von pBACOV und der triparentalen Konjugation zu untersuchen, wurden 28 Vertreter der Gattungen *Bacillus*, *Fictibacillus* und *Paenibacillus* aus den

Stammsammlungen des Lehrstuhls für Mikrobiologie (TUM) und des Lehrstuhls für mikrobielle Ökologie (TUM) auf ihre Eignung für Konjugationsexperimente überprüft. Dazu kamen sechs Milchsäurebildner aus der Stammsammlung des ATB Potsdam (Gattungen *Bacillus*, *Lactobacillus* und *Lactococcus*). Das einzige Vorauswahlkriterium war eine ausreichende Kan-Sensitivität bei gleichzeitiger Pol-Resistenz. Dieses Kriterium erfüllten 14 Stämme aus den Stammsammlungen der TUM und 5 Stämme des ATB. pBACOV-*sfGFP* konnte mit den Ausnahmen *B. megaterium* DSM 32 und *B. oleronius* WS8036 erfolgreich auf alle ausgewählten Stämme übertragen werden. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass das Plasmid in den vier Gattungen *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus* und *Lactococcus* funktional ist.

Die erfolgreich transformierten Arten gehören zur Klasse der *Bacilli* und weisen eine hohe phylogenetische Bandbreite auf. Die Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* gehören eigenen Familien innerhalb der Ordnung *Bacillales* an, während *Lactobacillus* und *Lactococcus* zu den Familien *Lactobacillaceae* bzw. *Streptococcaceae* innerhalb der Ordnung der *Lactobacillales* gehören (Ludwig et al., 2009). Zudem sind die Habitate der verwendeten Stämme vielfältig. Bei den Vertretern der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* handelt es sich um Bodenbakterien, die jedoch in verschiedensten Lebensräumen nachgewiesen werden können (Logan & Vos, 2015). Beispielsweise wurde ein mariner *B. sonorensis*-Stamm aus der Muschel *Paphia malabarica* isoliert (Nerurkar et al., 2015). Dagegen kommen Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus delbrueckii* in Milch und Milchprodukten vor, wobei die hier verwendeten Stämme aus Kartoffeln bzw. Kartoffelfruchtwasser isoliert wurden.

Auch physiologisch sind die in dieser Arbeit gentechnisch zugänglich gemachten Arten sehr divers. Das Spektrum reicht von aeroben bzw. fakultativ anaeroben (*Bacillus*, *Paenibacillus*) bis zu microaerophilen Bakterien (*Lactobacillus*, *Lactococcus*), von mesophilen (Temperaturoptimum von *B. mycoides*: 30 °C) bis zu thermophilen Arten (Temperaturoptimum von *B. coagulans* und *L. delbrueckii*: 52 °C). Sporenbildner sind mit den Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* ebenso vertreten wie die asporogenen Gattungen *Lactobacillus* und *Lactococcus*.

P. polymyxa weist, neben der in dieser Arbeit erforschten Anwendung als Produktionswirt heterologer Enzyme, eine Vielzahl an Besonderheiten auf. So fördert *P. polymyxa* das Pflanzenwachstum und produziert antimikrobielle Substanzen wie Polymyxine und Fusaricidine, die in der Medizin Anwendung finden (Grady et al., 2016). Darüber hinaus ist *P. polymyxa* in der Lage, Stickstoff zu fixieren und Exopolysaccharide zu produzieren, die von biotechnologischem Interesse sind (Logan & Vos, 2015; Rütering et al., 2017).

Der pUB-Replikationsursprung von pBACOV stammt aus *Staphylococcus aureus* und ist in einer großen Bandbreite an niedrig-GC Gram-positiven Bakterien (*Firmicutes*) aktiv, darunter auch in den anaeroben *Clostridien* (Espinosa et al., 1995; Lin & Blaschek, 1984). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass pBAVOC auch noch auf weitere Gattungen innerhalb der *Firmicutes* übertragen werden kann.

Bei den Arbeiten zum Gentransfer mittels triparentaler Konjugation ging es nicht darum, die Transfereffizienz zwischen *E. coli* und den Akzeptorstämmen zu optimieren. Viel mehr sollte ein einfaches, robustes und vielseitig anwendbares Protokoll etabliert werden, welches auf möglichst viele Stämme angewendet werden kann, ohne auf die einzelnen Akzeptoren angepasst werden zu müssen. Dass dieses Ziel erreicht wurde zeigt sich daran, dass der Plasmidtransfer bei 89 % der getesteten Stämme erfolgreich war. Die Versuche scheiterten nur bei *B. megaterium* DSM 32 und *B. oleronius* WS8036. Bei *B. oleronius* WS8036 zeigte sich, dass die gewählte Pol-Konzentration von 2,5 µg/ml zu niedrig für die Selektion gegen *E. coli* war. Die Gründe für das Fehlschlagen bei *B. megaterium* DSM 32 bleiben unbekannt, aber möglicherweise spielt die besondere Struktur der Zellhülle von *B. megaterium* eine Rolle (Johnson & Grossman, 2016). Da ein und dasselbe Protokoll für alle Akzeptoren angewendet werden kann, ist die Methode auch dafür geeignet, mehrere Akzeptorstämme gleichzeitig zu transkonjugieren. So kann eine Vielzahl von potenziell interessanten Akzeptorstämmen in kurzer Zeit auf gentechnische Zugänglichkeit untersucht werden, ohne für jeden Stamm die Methode adaptieren zu müssen. Auch kann so durch Transfer eines Expressionsplasmids mit einem Enzym-kodierenden Gen sehr rasch eine Vielzahl an Stämmen unterschiedlicher

Gattungen und Arten daraufhin analysiert werden, welche(r) der Stämme für die Produktion des Enzyms am besten geeignet sein könnte.

pBACOV-*sfGFP* konnte nicht nur erfolgreich auf häufig angewendete und gut erforschte Arten wie *B. licheniformis* und *B. subtilis* übertragen werden, sondern auch auf „exotischere“ Arten. Bei den hier durchgeführten Versuchen handelt es sich um die erste erfolgreiche Anwendung rekombinanter DNA-Technologie in *B. sonorensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. vallismortis* und *B. mojavensis*. Somit wurden diese Arten durch diese Arbeit für gentechnische Anwendungen zugänglich gemacht. Dies gilt auch für die milchsäurebildenden Stämme des ATB Potsdam. Bei diesen Stämmen handelt es sich um Wildisolate, welche in Produktionsprozessen sehr effizient arbeiten. Derartige Stämme sind oft nur sehr schwer gentechnisch zugänglich, und dennoch war der Plasmidtransfer erfolgreich. Da *Bacillus*-Spezies allgemein ein hohes Potenzial für biotechnologische Anwendungen haben, besteht ein allgemeines Interesse daran, neue Stämme gentechnisch zugänglich zu machen (Heinze et al., 2018a), was durch pBACOV in Kombination mit der triparentalen Konjugation nun möglich ist.

Die Expression heterologer Zielgene wird in pBACOV über den P_{aprE} -Promoter aus *B. subtilis* reguliert (Bien et al., 2014; Ferrari et al., 1988; Jan et al., 2000; Westers et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression heterologer Gene unter Kontrolle von P_{aprE} in sieben weiteren Spezies möglich ist. Dazu wurde *sfGFP* als leicht detektierbares Reportergen intrazellulär exprimiert. So gelang der erste Nachweis heterologer Genexpression in vier neuen Arten, namentlich *B. mojavensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* und *B. vallismortis*. Die beobachtete *sfGFP*-Expression, gemessen anhand der sfGFP-Fluoreszenz pro Zellzahl, lag zwischen 15 % und 383 % der *sfGFP*-Expression in *B. subtilis*. Die Gründe für diese starken Unterschiede in der apparenten *sfGFP*-Expression sind bislang unbekannt. Möglicherweise leisten Unterschiede der Expressionsmaschinerien der verschiedenen Stämme (Promotorerkennung, mRNA-Stabilität, Faltungseffizienz des sfGFP) und unterschiedliche Kopiezahlen des Plasmids einen Beitrag zu dieser Beobachtung.

Bei einigen Arten, wie beispielsweise *P. polymyxa*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *B. coagulans*

oder *B. subtilis*, wurden bei den Konjugationsansätzen sehr viele Kolonien erhalten. Entsprechend ist die Methode auch geeignet, um Bibliotheken (z. B. SP-Bibliotheken) in neuen Stämmen zu durchmustern, was in dieser Arbeit auch genutzt wurde. Selbst wenn nur eine relativ geringe Anzahl an Kolonien erzeugt wurde, ist dies denkbar, da sich die Größe des Konjugationsansatzes leicht nach oben skalieren lässt. Dazu müssen lediglich mehr als 2 ml pro Kultur vereinigt werden, auf mehr oder größere KreuzungsfILTER ausgebracht werden und eine größere Anzahl von Selektionsplatten verwendet werden. Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber Transformationsmethoden mit gereinigter DNA dar, da bei diesen Methoden große Mengen an Plasmid-DNA gereinigt werden müssen.

Eine Einschränkung des hier vorgestellten Systems ist die Tatsache, dass der Akzeptorstamm Kan-sensitiv und Pol-resistent sein muss. Von den 34 Stämmen, die in dieser Studie getestet wurden, erfüllten nur 19 diese Anforderung (ca. 56 %). Die Selektion der Transkonjuganten basiert auf der plasmidvermittelten Kan-Resistenz. Die Vielseitigkeit von pBACOV ließe sich durch Plasmidvarianten mit anderen Resistenzmarkern (z. B. Chloramphenicol oder Tetracyclin) erhöhen, oder durch das Einfügen zusätzlicher Resistenzgene in pBACOV. Zur Selektion gegen *E. coli* nach der Plasmidübertragung ist die minimale Hemmkonzentration von Pol essenziell. Die Ergebnisse zeigten, dass mit der eingesetzten Methode mindestens 10 µg/ml Pol für eine effiziente Selektion gegen die eingesetzten *E. coli* Zellen notwendig sind. Wenn wie bei den Konjugationsversuchen mit *B. oleronius* lediglich 2,5 µg/ml Pol zum Einsatz kamen, wuchsen zu viele *E. coli* Kolonien hoch, als dass es möglich gewesen wäre, transkonjugante *B. oleronius*-Kolonien zu selektieren. Auch bei 10 µg/ml Pol wuchsen einzelne *E. coli*-Kolonien, sodass es nötig war, positive Transkonjuganten durch umfangreiche Tests zu identifizieren. Hierbei erfolgten die Vorselektion anhand der Koloniemorphologie und die eindeutige Identifizierung anhand einer 16S rRNA-Gensequenzierung. Alternative Methoden, wie beispielsweise die Gram-Färbung, könnten ebenfalls helfen, um zwischen falsch-positiven *E. coli* Kolonien und tatsächlichen Transkonjuganten zu unterscheiden. Eine gute Alternative für eine effiziente Selektion gegen *E. coli* stellen Kulturmedien dar, die das Wachstum von *E. coli* hemmen. Ein

Beispiel hierfür ist MRS-Agar (De Man et al., 1960), welcher in dieser Arbeit für die Kultivierung und Transkonjugation der Milchsäurebildner des ATB Potsdam verwendet wurde. Hier konnte auf Pol im Selektionsagar verzichtet werden. Da bei Temperaturen über ca. 45 °C das Wachstum von *E. coli*-Laborstämmen inhibiert wird (Rudolph et al., 2010), ist die Inkubation der Selektionsplatten bei Temperaturen über 45 °C eine weitere Methode zur Eliminierung der *E. coli* Zellen, sofern dies mit dem jeweiligen Akzeptorstamm möglich ist.

4.2 *P. polymyxa* DSM 292 als neuer Wirt für die sekretorische Produktion heterologer Cellulasen

Um die Möglichkeiten des in dieser Arbeit entwickelten Systems zur Genübertragung in Gram-positive Bakterien zu demonstrieren, wurde versucht, mit P. polymyxa DSM 292 einen neuen Organismus für die sekretorische Produktion heterologer Glycosidhydrolasen zu etablieren. Während bei der Fermentation und der gezielten Gendeletion noch Hindernisse zu bewältigen sind, konnte die Produktionsleistung des Stammes durch Identifikation geeigneter Signalpeptide, die Optimierung des Kulturmediums und durch neue Promotoren erfolgreich gesteigert werden.

4.2.1 Auswahl von *P. polymyxa* DSM 292 und Machbarkeitsnachweis

Als Kandidaten für umfassende Versuche zur sekretorischen Produktion heterologer Glycosidhydrolasen kamen die Stämme in Betracht, bei denen die Versuche zur Transkonjugation und *sfGFP*-Expression erfolgreich waren. Diese Stämme wurden hinsichtlich ihrer extrazellulären Hydrolaseproduktion, der Proteinsekretion und ihres Wachstums in LB-Medium untersucht. Mit *P. polymyxa* DSM 292 wurde ein Stamm identifiziert, der sich insbesondere durch geringe extrazelluläre Proteaseaktivität auszeichnete. Zudem ist die sekretorische Enzymproduktion in der Gattung *Paenibacillus* bislang noch nicht beschrieben. Aktuell erregen neue sekretorische Expressionssysteme wie *Corynebacterium glutamicum*, *Streptomyces lividans* oder *Lactococcus lactis* Aufmerksamkeit, da sie wertvolle Alternativen darstellen, wenn ein Protein nicht in etablierten *Bacillus*-Stämmen sekretiert werden kann (Freudl, 2018). Da es jedoch bisher keinen Expressions- und Sekretionswirt gibt, der universell geeignet wäre für die heterologe Proteinproduktion und auch oft unklar ist, wieso viele Proteine nicht effizient heterolog produziert werden können, gibt es weiterhin erheblichen Bedarf an neuen, alternativen Wirtsorganismen sowohl für die Grundlagenforschung, als auch für die industrielle Produktion. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb *P. polymyxa* DSM 292 für die Etablierung als weiterer möglicher Produktionsorganismus für

heterologe Glycosidhydrolasen ausgewählt.

Für den Machbarkeitsnachweis wurde das Zielgen *cel8A* aus *H. thermocellum* ausgewählt. Die Endoglucanase Cel8A ist schon seit den 1980er Jahren Gegenstand intensiver Forschung und wurde sowohl in *E. coli* als auch in *B. subtilis* und *Geobacillus stearothermophilus* (ehemals *Bacillus stearothermophilus*) produziert (Bien et al., 2014; Joliff et al., 1989; Leis et al., 2017; Liu et al., 2012; Schwarz et al., 1986; Soutschek-Bauer & Staudenbauer, 1987). Durch den modularen Aufbau aus der katalytischen GH8-Domäne und dem C-terminal lokalisierten Dockerin-Modul ist die Produktion von Cel8A mit gewissen Herausforderungen verbunden, da beispielsweise die *linker*-Region eine exponierte Angriffsstelle für Proteasen darstellt (Linder & Teeri, 1997).

Während industriell etablierte *Bacillus*-Expressionsstämme ihre nativen Enzyme in Konzentrationen bis zu 20 g/l Liter an das Kulturmedium abgeben können (Schallmey et al., 2004), ist die Effizienz bei der Sekretion heterologer Proteine oft um Größenordnungen niedriger und liegt oft nur im Bereich einiger Milligramm oder gar Mikrogramm pro Liter oder scheitert vollständig (Freudl, 2018; Harwood & Cranenburgh, 2008). In ersten Versuchen konnten in dieser Arbeit rund 30 U/l Cel8A im Kulturüberstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-*cel8A* nachgewiesen werden, was einen guten Ausgangspunkt für die Optimierung der Ausbeute darstellte. Zusätzlich wurden mit *cel9D*, *cel9R* und *xgh74A* drei weitere Gene aus *H. thermocellum* in pBACOV eingefügt und ihre Produktion in *P. polymyxa* DSM 292 untersucht.

4.2.2 Optimierung der Produktivität

Die Art des verwendeten Signalpeptids ist einer der wichtigsten Parameter bei Versuchen, heterologe Proteine erfolgreich in wirtschaftlich relevanten Mengen zu sekretieren (Freudl, 2018). Somit ist die Identifizierung eines geeigneten Signalpeptids ein erfolgsversprechender Ansatz, um die Sekretion eines Zielproteins zu erhöhen. Da die bioinformatische Vorhersage eines idealen SP nicht möglich ist, werden in der Regel SP-Bibliotheken für ein Zielgen erstellt und experimentell durchmustert (Bien et al., 2014; Brockmeier et al., 2006; Degering et al., 2010; Song et al., 2015). Um geeignete SP für

die sekretorische Produktion heterologer Glycosidhydrolasen in *P. polymyxa* DSM 292 zu finden, wurden für die Zielgene *cel8A*, *cel9D*, *cel9R* und *xgh74A* aus *H. thermocellum* insgesamt sechs SP-Bibliotheken erstellt und durchmustert. Dabei wurden für jedes Zielgen geeignete SP gefunden, die eine sekretorische Expression von stabilem Volllängenprotein ermöglichten. Zudem wurden für die Zielgene *cel8A*, *cel9D* und *cel9R* Produktivitätssteigerungen auf 140 %, 322 % bzw. bis 192 % gegenüber dem ursprünglich vorhandenen SP_{*aprE*} erzielt. Bei *xgh74A* war die gemessene XGase-Aktivität im Kulturüberstand mit SP_{*aprE*} am höchsten.

Ein Vergleich der gefundenen SP zwischen den einzelnen Bibliotheken zeigt einige Besonderheiten auf. Von den 173 SP, welche in der verwendeten SP-kodierenden DNA Mischung enthalten waren, tauchten insgesamt 64 verschiedene in den ausgewählten Klonen der sechs SP-Bibliotheken auf, davon elf SP in mehr als einer Bibliothek (Tabelle 49). SP_{*csn*}, SP_{*yprB*} und SP_{*yurI*} wurden in beiden *cel8A* SP-Bibliotheken gefunden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sie gute Kandidaten für die Verwendung in Kombination mit *cel8A* sind (orange Rahmen in Tabelle 49). Fünf SP tauchten in *cel8A* Bib2 und *cel9D* Bib2 auf, jenen SP-Bibliotheken, die mit Medium 2 durchmustert wurden. Möglicherweise sind diese SP unter den Bedingungen in Medium 2 also besonders effizient, unabhängig vom Zielgen (blauer Rahmen in Tabelle 49). SP_{*mdr*} ist besonders hervorzuheben, da es bei drei von vier Zielgenen gefunden wurde, was auf eine möglicherweise universelle Anwendbarkeit dieses SP hindeutet. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der für die Sekretion eines Enzyms als am besten geeignet identifizierten SP mittels multiplem Alignment (Clustal Omega, Sievers et al., 2011) konnten keine auffälligen Besonderheiten ausgemacht werden.

Tabelle 49: Übersicht von SP, die in mehr als einer SP-Bibliothek identifiziert wurden. Blauer Rahmen: SP, die in *cel8A* Bib2 und *cel9D* Bib2 gefunden wurden, und somit vermutlich gute Kandidaten für die Verwendung mit Medium 2 sind. Oranger Rahmen: SP, die in beiden *cel8A* SP-Bibliotheken gefunden wurden und somit gute Kandidaten für die Verwendung mit *cel8A* sein können. Grüner Rahmen: Universelles SP, das in Kombination mit drei verschiedenen Zielgenen auftauchte.

SP	GEFUNDEN IN					
	<i>cel8A</i> Bib1	<i>cel8A</i> Bib2	<i>cel9D</i> Bib1	<i>cel9D</i> Bib2	<i>cel9R</i> Bib	<i>xgh74A</i> Bib
csn	✓	✓		✓		
mdr		✓		✓	✓	
amyE		✓		✓		
fliL		✓		✓		
ybbC		✓		✓		
ypmB	✓	✓			✓	
yurI	✓	✓				
yycP	✓			✓		
vpr	✓			✓		
glpQ		✓	✓			
yjdB	✓					✓

Die Arbeit von Bien et al. (2014) beschreibt die Durchmusterung von SP-Bibliotheken in *B. subtilis*, die mit dem gleichen SP-Mix von TaKaRa-Bio erstellt wurden, der auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Als Zielgene verwendeten Bien et al. (2014) die Zielgene *cel8A*, *cel5B*, *cel9K* und *cel48S* aus *H. thermocellum*. Somit ist insbesondere der Vergleich der dort gefundenen SP für *cel8A* mit den besten SP dieser Arbeit interessant. Bien et al. (2014) wählten für *cel8A* die folgenden sieben SP aus: SP_{pbpD} , SP_{pel} , SP_{yobB} , SP_{ydjM} , SP_{ywtF} , SP_{csn} und SP_{yabK} . Zwei davon, namentlich SP_{csn} und SP_{pel} , wurden auch in dieser Arbeit als gut geeignete SP für die Sekretion von Cel8A identifiziert. Somit scheint das optimale SP für ein Zielenzym nicht nur vom betreffenden Enzym selbst abzuhängen, sondern auch von den anderen Expressionsbedingungen, insbesondere der Wahl des Expressionsstammes.

Neben der Identifikation geeigneter SP sollte auch durch die Koexpression von Chaperonen die Konzentration sekretierter Zielenzyme im Überstand erhöht werden. Das dafür entwickelte Operon war funktional und ermöglichte die erfolgreiche Koexpression des Zielgens *cel8A* und der Chaperone PrsA und DnaK aus *P. polymyxa* DSM 292 sowie

DnaK aus *H. thermocellum*. Sowohl für PrsA als auch DnaK konnte eine begünstigende Wirkung auf die Sekretion heterologer Enzyme in *B. subtilis* gezeigt werden (Chen et al., 2015). Die sogenannte „Foldase“ PrsA ist ein extracytoplasmatisches Lipoprotein, welches an der Außenseite der Zellmembran verankert ist und die Faltung von Proteinen nach der Translokation durch den Sec-Pathway unterstützt (Westers et al., 2004). Somit ist es naheliegend, dass die Überexpression von *prsA* die Ausbeute an korrekt gefalteten Proteinen im Kulturüberstand begünstigen kann. Dies wurde beispielsweise von Wu et al. (1998) in *B. subtilis* anhand eines Antikörperfragments gezeigt. Zudem kann PrsA ein limitierender Faktor bei der Sekretion heterologer Enzyme sein (Kontinen & Sarvas, 1993). Die vom *dnaK*-Operon kodierten intrazellulären Chaperone unterstützen einerseits die Faltung intrazellulärer Proteine, andererseits verringern sie auch die Aggregation überexprimierter Proteine und halten Prä-Proteine in einer Konformation, die die Translokation begünstigt (Chen et al., 2015). Obwohl die Koexpression der Chaperongene für PrsA und DnaK in dieser Arbeit erfolgreich war, führte dies nicht zu einer Erhöhung der Cel8A-Aktivität im Kulturüberstand. Dies weist darauf hin, dass die intrazelluläre Aggregation des Prä-Proteins sowie die Faltung des sekretierten Zielproteins unmittelbar nach der Translokation im Falle der Überexpression von *cel8A* in *P. polymyxa* DSM 292 vermutlich nicht die limitierenden Schritte sind. Alternativ ist es auch denkbar, dass die gewählten Chaperone nicht zum Zielprotein passen und andere Chaperone durchaus eine Erhöhung der Sekretion von aktivem Cel8A bewirken könnten. Dies könnte mit weiteren Versuchen, z. B. mit verschiedenen Chaperonen aus dem Genom von *H. thermocellum*, analysiert werden.

Das Expressionsmedium wurde mittels einer Plackett-Burman-Matrix mit elf Faktoren optimiert. Statistische Methoden, inklusive der Plackett-Burman-Matrix, kommen häufig zur Optimierung von Kulturmedien für die biotechnologische Produktion von Proteinen oder anderen Zielsubstanzen zum Einsatz (Singh et al., 2017). Dabei konnten allein durch die Verwendung von Plackett-Burman-Matrizen 1,45- bis 11,5-fache Ausbeutesteigerungen erzielt werden (Narasimhan & Shivakumar, 2012; Singh et al., 2017). Plackett-Burman-Matrizen sind normalerweise der Ausgangspunkt für weiterführende Optimierungsschritte mittels *Response Surface* Methoden (RSM), wie

beispielsweise Box-Behnken Design oder Central Composite Design. Die RSM-basierte Optimierung liefert in vielen Fällen eine weitere Produktionssteigerung um das 3,3- bis 13,4-fache (Fang et al., 2010; Farhat-Khemakhem et al., 2012; Singh et al., 2017). Da sich diese Arbeit schwerpunktmäßig auf die molekularbiologische Optimierung der Enzymproduktion konzentrierte, wurde kein weiterführender Versuch zur Medienverbesserung mittels RSM unternommen. Trotzdem wurde mit der hier durchgeführten Medienoptimierung eine mehr als dreifache Ausbeutesteigerung erzielt (*P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB-cel8A} in LB-S: $884 \pm 29,0$ U/l; in Medium 2 bei 37 °C: $2\,883 \pm 215$ U/l).

Der vierte Ansatz zur Optimierung der Produktionsleistung von *P. polymyxa* DSM 292 war die Verwendung alternativer Promotoren. Die umfangreich charakterisierten *B. subtilis*-Promotoren P₄₃ und P_{trnQ} erwiesen sich als ungeeignet, um *cel8A* in *P. polymyxa* DSM 292 zu exprimieren. Mit diesen Promotoren konnte Cel8A weder im Überstand noch im Zellpellet nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die Produktion nicht an der Sekretion scheiterte, sondern bereits bei der Expression des Zielgens. In *B. subtilis* reguliert P₄₃ die Expression des *cdd*-Gens, das eine Cytidineaminase kodiert (Song & Neuhaard, 1989). Mittels TBLASTN (Altschul et al., 2005) wurde ein homologes Gen zu *cdd* im Genom von *P. polymyxa* DSM 292 identifiziert. Der dazugehörige Promotor wurde als P_{43P} bezeichnet und ebenfalls getestet, lieferte jedoch ebenfalls ein negatives Ergebnis. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das klonierte P_{43P}-Fragment eine verkürzte Version des Promotors darstellte, sodass vielleicht essenzielle regulatorische Elemente oder Transkriptionsfaktorbindestellen fehlten.

Der Xylose-induzierbare Promotor P_{xyIA+} aus *B. megaterium* mit optimierter RBS (*rbs*⁺) konnte in LB-S erfolgreich für die sekretorische *cel8A*-Expression in *P. polymyxa* DSM 292 eingesetzt werden. Hingegen war mit der nativen Promotorsequenz (P_{xyIA}) keine Cel8A-Produktion nachweisbar, obwohl sich die beiden Promotoren nur in 4 Nucleotiden unterscheiden (siehe Abbildung 25). Dies zeigt, dass die RBS eine zentrale Rolle bei der *cel8A*-Genexpression in *P. polymyxa* DSM 292 spielt. Mit P_{xyIA+} lag die

Cel8A-Aktivität im Überstand bei ca. 74 % des Referenzpromotors P_{aprE} . Wie erwartet war die Zugabe von Xylose essenziell für die Expression des Zielgens. Es gab keine Hinweise auf eine „undichte“ Expression in Kulturen ohne Xylose. Dies zeigt, dass das Xylose-induzierbare Expressionssystem aus *B. megaterium* auch in *P. polymyxa* DSM 292 anwendbar ist, wenn die optimierte RBS von Malten et al. (2005) zum Einsatz kommt.

Während die *cel8A*-Expression in LB-S mit P_{xylA+} gut reguliert werden konnte, war sie in Medium 2 im Vergleich zu P_{aprE} stark reduziert, unabhängig von der Xylosezugabe. Dies deutet auf einen Verlust der Induzierbarkeit des Promotors hin. Dies lag sehr wahrscheinlich an Katabolitrepression durch die in Medium 2 enthaltene Glucose. Glucose ist als „Anti-Induktor“ der *xylA*-Expression in *B. megaterium* bekannt, da sie mit Xylose um die Anbindung an den Xyloserepressor XylR konkurriert (Dahl et al., 1995). Die verminderte Aufnahme alternativer Kohlenstoffquellen ist ein weiterer Mechanismus der Katabolitrepression (Görke & Stülke, 2008). Eine Transkriptomanalyse von *Paenibacillus* sp. JDR-2 zeigte eine Glucose-abhängige Herunterregulierung von Genen, die an der Xyloseaufnahme beteiligt sind (Sawhney et al., 2016). Ähnliche Effekte könnten auch in *P. polymyxa* DSM 292 auftreten. Demnach ist glucosehaltiges Medium 2 ungeeignet, um Zielgene unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors zu exprimieren. In Fällen, in denen auf ein Xylose-induzierbares System zurückgegriffen werden muss, kann P_{xylA+} in einem Glucose-freien Medium wie LB-S oder Medium 2 mit einer alternativen Kohlenstoffquelle, z. B. Glycerin, eingesetzt werden. Induzierbare Systeme sind immer dann von Vorteil, wenn Substanzen hergestellt werden sollen, welche eine toxische Wirkung auf den Produktionswirt haben.

P_{yib} ist ein weiterer Promotor, der in *P. polymyxa* DSM 292 aktiv ist. Dieser autoinduzierbare Promotor wurde ursprünglich von Yu et al. (2015) bei einer Durchmusterung der Promotoren im Genom von *B. subtilis* per Microarray beschrieben. Bei Kultivierung von *P. polymyxa* DSM 292 in LB-S lieferte P_{yib} eine um 136 % erhöhte Cel8A-Aktivität im Überstand als P_{aprE} . Somit war P_{yib} der aktivste Promotor in LB-S. In Medium 2 blieb die Cel8A-Produktion mit P_{yib} im Vergleich zu LB-S annähernd konstant

bei etwa 2 000 U/l. Dies zeigt, dass die Zusammensetzung von Medium 2 keinen positiven Einfluss auf die Cel8A-Produktion mittels P_{y1b} in *P. polymyxa* DSM 292 hat. Möglicherweise handelt es sich bei P_{y1b} um einen konstitutiven Promotor, dessen Expressionsniveau unabhängig von den Umwelteinflüssen bzw. der Medienzusammensetzung ist.

Zusätzlich zu diesen bereits in der Literatur beschriebenen Promotoren wurden auch neue Promotoren getestet, welche die Expression von hochkonzentrierten Proteinen im Sekretom von *P. polymyxa* DSM 292 regulieren. Die innovative Strategie, Promotoren auf Basis quantitativer LC-MS/MS-Daten auszuwählen, wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal verfolgt (Heinze et al., 2018b). Normalerweise werden Promotoren über Transkriptomanalysen mittels Micorarrays (Nicolas et al., 2012; Yu et al., 2015) oder RNA-seq (Creecy & Conway, 2015) identifiziert. Diese Methoden wurden für die Untersuchung der Genexpression entwickelt und liefern genaue Informationen über die Genregulation und Promotorstärke. Dennoch sprachen bei der Fragestellung dieser Arbeit zwei Gründe gegen eine Promotorauswahl anhand von Transkriptomdaten. Zum einen waren keine geeigneten publizierten Transkriptomdaten verfügbar. Darüber hinaus liefern Transkriptomanalysen nur Informationen über die Promotorstärke sowie die Transkription. Die sekretorische Proteinproduktion ist hingegen ein komplexer Prozess, der nicht nur vom Transkriptionsniveau abhängt, sondern auch von einer effizienten Translation und Sekretion. Entsprechend war es das Ziel, Promotorregionen nicht nur anhand der Promotorstärke auszuwählen, sondern regulatorische Elemente zu finden, die für eine effiziente Proteinsekretion unter Berücksichtigung aller Schritte von Transkription bis Sekretion geeignet sind. Aus diesem Grund wurde die Abundanz der am meisten ins Medium sekretierten Proteine als Kriterium für die Auswahl von Expressionssignalen herangezogen. Dazu wurden die häufigsten Proteine im Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-cel8A mittels quantitativer LC-MS/MS identifiziert. Dabei wurde festgestellt, dass fünf der sechs häufigsten Proteine im Überstand ein mit bioinformatischen Methoden identifizierbares SP aufwiesen (SignalP 4.1, Petersen et al., 2011). Eines dieser Proteine war das heterologe Zielprotein Cel8A, welches somit ähnlich stark sekretiert wurde wie die abundantesten Wirtsproteine. Dies

zeigt, dass die Sekretionsmaschinerie von *P. polymyxa* DSM 292 in Kombination mit dem verwendeten Expressionssystem heterologe Proteine effektiv transportieren kann. Somit wäre bei einer Steigerung der Gesamtsekretion bzw. bei einer Erhöhung der Zelldichte, beispielsweise durch optimierte Wachstumsbedingungen, eine Steigerung der Cel8A-Produktion zu erwarten.

Die *cel8A*-Expression wurde mit den Promotoren der vier am stärksten sekretierten Wirtsproteine untersucht (PPOLYM_01680, PPOLYM_02218, PPOLYM_03468 und PPOLYM_04737). Dabei wurden die Promotoren in Kombination mit dem jeweiligen nativen SP bzw. mit SP_{lipB} vor das Zielgen in pBACOV eingefügt. Die Ergebnisse zeigten, dass in Abhängigkeit von der jeweiligen Promotorsequenz entweder das native SP oder SP_{lipB} die bessere Cel8A-Sekretion bewirkte. Neben der bereits bekannten Tatsache, dass eine zuverlässige Vorhersage eines geeigneten SP für ein Zielgen nicht möglich ist (Brockmeier et al., 2006; Degering et al., 2010; Hemmerich et al., 2016; Song et al., 2015), lässt sich nun die Beobachtung hinzufügen, dass die Effizienz eines SPs auch vom genetischen Umfeld des Zielgens, in diesem Fall dem Promotor, abhängig zu sein scheint. Beispielsweise ist SP_{lipB} in Kombination mit den Promotoren P_{aprE}, P₀₂₂₁₈, P₀₃₄₆₈ und P₀₄₇₃₇ gut für die *cel8A*-Expression geeignet, während die Kombination P₀₁₆₈₀-SP_{lipB} nur eine sehr geringe Cel8A-Ausbeute lieferte. Dass dies nicht an P₀₁₆₈₀ alleine liegt, zeigt sich daran, dass dieser Promotor in Kombination mit seinem nativen SP eine starke Cel8A-Sekretion bewirkte. Somit ist die Auswahl des idealen SP ein multifaktoriell beeinflusster Vorgang, der vom Zielgen, dem Expressionsstamm und dem Promotor abhängig ist (Brockmeier et al., 2006; Freudl, 2018; Heinze et al., 2018b; Hemmerich et al., 2016).

Die Hypothese, dass der Promotor eines stark sekretierten Wirtsproteins ein guter Kandidat für die heterologe Genexpression eines sekretierten Zielenzyms ist, wurde durch die Versuche mit P₀₃₄₆₈ untermauert. In Kombination mit SP_{lipB} lieferte dieser Promotor eine Cel8A-Aktivität von $5\,475 \pm 411$ U/l im Überstand von *P. polymyxa* DSM292 in Medium 2. Somit konnte die sekretorische Cel8A-Produktion durch Kombination der Ergebnisse der Medienoptimierung und der Promotoridentifizierung

mittels LC-MS/MS um das 6,2-fache erhöht werden (von $884 \pm 29,0$ U/l mit $P_{aprE}\text{-SP}_{lipB}$ in LB-S auf $5\,475 \pm 411$ U/l mit $P_{03468}\text{-SP}_{lipB}$ in Medium 2). Dabei ist festzustellen, dass Cel8A unter diesen Bedingungen im Überstand sogar höher konzentriert vorlag als das natürlicherweise von P_{03468} regulierte Protein PPOLYM_03468 (siehe Tabelle 44). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die höhere Kopienzahl der auf dem Plasmid lokalisierten Expressionskassette im Vergleich zum Gen *ppolym_03468* im Genom. Die Ausbeute von Cel8A im Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 $pP_{03468}\text{-SP}_{lipB}\text{-cel8A}$ in Medium 2 kann auf ca. 348 mg/l geschätzt werden. Dieser Wert beruht auf der spezifischen CMC-Case-Aktivität des gereinigten Cel8A-Referenzproteins (produziert in *E. coli*), welches zur Erstellung der Kalibrierkurve des Azo-CMC-Tests verwendet wurde.

Für eine biotechnologische Anwendung der produzierten Enzyme ist nicht nur die enzymatische Aktivität im Überstand relevant. Ebenso ist es wichtig, das Volllängenenzym reinigen zu können, sodass es voll funktionsfähig angewendet werden kann. Dies kann insbesondere bei Cellulasen herausfordernd sein, da sie in der Regel mehrere Domänen bzw. Module besitzen. So bestehen die hier verwendeten cellulosomal Enzyme von *H. thermocellum* mindestens aus einem katalytischen GH-Modul und einem Dockerin-Modul, welches für die Anbindung des Enzyms an das Scaffoldin-Gerüst zuständig ist (Leis et al., 2017; Schwarz, 2001). Zusätzlich können noch CBMs (*carbohydrate binding module*) vorhanden sein, wie beispielsweise bei Cel9R (Schwarz, 2001; Zverlov et al., 2005a). Die einzelnen Module sind mittels *linker*-Peptiden verbunden, welche gestreckt bzw. ungefalted vorliegen und eine hohe Flexibilität aufweisen, damit die Module ihre jeweiligen Aufgaben unabhängig ausführen können (Gustavsson et al., 2001). Durch die flexible, ausgestreckte Konformation sind die *linker*-Regionen aber besonders anfällig für proteolytischen Abbau (Gustavsson et al., 2001; Linder & Teeri, 1997).

Vor diesem Hintergrund war die Beobachtung von stabilem Volllängen-Cel8A im Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 ein wichtiges Zwischenziel dieser Arbeit (vgl. Abbildung 8). Ein intakter *linker* ist essenziell, um das Volllängenprotein über den C-terminalen His₆-tag reinigen zu können und neben der katalytischen Aktivität auch die

Fähigkeit zur Komplexbildung mit dem cellulosomalalen Scaffoldin zu gewährleisten. Mittels IMAC (5 ml HisTrap FF crude-Säule) konnten aus 500 ml Kulturüberstand von *P. polymyxa* DSM 292 pBACOV-SP_{lipB}-*cel8A* (LB-S Medium) ca. 1,5 mg gereinigtes Cel8A gewonnen werden. Das gereinigte Cel8A wurde anschließend hinsichtlich seiner wichtigsten Eigenschaften charakterisiert. Das Produkt wies die erwartete Länge des Vollängenenzym auf und zeigte eine erfolgreiche Komplexbildung mit dem Scaffoldin-Protein CipA6.2, die über das *linker*-gebundene Dockerin-Modul von Cel8A bzw. die Cohesin-Module in CipA6.2 vermittelt wurde. Die vergleichende Untersuchung der Aktivität von gereinigtem Cel8A aus dem Überstand von *P. polymyxa* DSM 292 und Cel8A aus *E. coli* auf CMC und BBG zeigte, dass die Aktivität des in *P. polymyxa* DSM 292 produzierten Enzyms niedriger als die des Referenzzyms war. Mögliche Ursachen für die geringere Aktivität von Cel8A aus *P. polymyxa* DSM 292 können Unterschiede in der Faltung oder bei posttranslationalen Modifikationen sowie eine geringere Reinheit des Eluats nach der IMAC sein.

Somit war es gelungen, voll funktionales Cel8A in *P. polymyxa* DSM 292 sekretorisch herzustellen. Dies konnte anhand (i) der Reinigung mittels C-terminalem His₆-tag, (ii) der Größenabschätzung mittels SDS-PAGE, (iii) des Aktivitätsnachweises auf BBG und CMC sowie (iv) der Komplexbildung mit CipA6.2 gezeigt werden.

Die Reinigung von intaktem Cel8A hing von der Verwendung von LB-S Medium ab. Bei der Verwendung von Medium 0 oder Medium 2 war zwar die Enzymaktivität im Kulturüberstand höher, jedoch konnten keine signifikanten Mengen an Vollängenprotein gereinigt werden (vgl. Kapitel 3.2.8 Enzymproduktion im Bioreaktor). Dies ist vermutlich auf eine erhöhte Produktion von Wirtsproteasen in diesen Medien zurückzuführen (sowohl im Bioreaktor als auch im Schüttelkolben). Dieses Ergebnis ist unerwartet, da die nicht nachweisbare Exoproteaseaktivität von *P. polymyxa* DSM 292 auf Magermilchagar ein entscheidendes Kriterium bei der Auswahl des Stammes war. Die Exoproteaseproduktion scheint von der Medienzusammensetzung abhängig zu sein. Obgleich berichtet wurde, dass Hefeextrakt im Vergleich zu Pepton zu deutlich geringerer Exoproteaseproduktion in *P. polymyxa* führt (Fogarty & Griffin, 1973), ist der komplexe

Medienbestandteil nicht allein ausschlaggebend für die Proteaseproduktion, da die erhöhte Proteolyse sowohl mit Sojapepton als auch Hefeextrakt in Medium 2 auftrat. Die eingesetzten Spurenelemente, der pH-Wert oder die Salze im Medium können ebenfalls eine Rolle spielen, genauso wie die höhere Zelldichte bei der Kultivierung in Medium 2.

Um das Potenzial von *P. polymyxa* DSM 292 für mögliche technische Anwendungen zu untersuchen, wurden Fermentationsversuche sowohl im Satz- als auch im Zulaufverfahren durchgeführt. Dabei kam Medium 0 (Satzverfahren) bzw. Medium 2 mit 5 g/l Hefeextrakt (Zulaufverfahren) zum Einsatz. Im Vergleich mit Literaturdaten zur Fermentation vom *P. polymyxa* DSM 365 zur Produktion von 2,3-Butandiol im Zulaufverfahren (Häßler et al., 2012) konnten mit den hier verwendeten Prozessparametern leicht erhöhte Zelldichten erzielt werden. Im Satzverfahren betrug die maximale gemessene OD₆₀₀ in dieser Arbeit 8,6 (nach 42 h) und im Zulaufverfahren 15,5 (nach 42 h) im Vergleich zu OD₆₀₀ = 6 (nach 24 h, 5 g/l Hefeextrakt im Medium) bei Häßler et al. (2012). Durch Erhöhung der Hefeextraktkonzentration konnten Häßler et al. (2012) mit *P. polymyxa* DSM 365 eine maximale OD₆₀₀ von 23 erreichen, was zeigt, dass auch für die Kultivierung von *P. polymyxa* DSM 292 im Zulaufverfahren noch Verbesserungspotenzial besteht. Jedoch ist selbst diese Zelldichte noch weit unter den Zelldichten, die mit *B. subtilis* oder anderen Hochleistungsstämmen im industriellen Maßstab erzielt werden. So sind mit *B. subtilis* im Zulaufverfahren OD₆₀₀-Werte von 60 (Produktion von Penicillin G Acyclase, Zhang et al., 2006), 95 (Produktion von Nattokinase, Cho et al., 2010) und sogar 138 (Produktion von Riboflavin, Wang et al., 2011) beschrieben worden.

Ein Hauptgrund für die deutlich geringere Zelldichte bei *P. polymyxa* ist vermutlich die EPS-Produktion. Die EPS-Produktion beeinträchtigt die Ausbeute und das Wachstum, da die im EPS gebundenen Saccharide nicht als C-Quelle zur Verfügung stehen, die erhöhte Viskosität das Mischen erschwert und zudem die Sauerstoffversorgung beeinträchtigt wird (Häßler et al., 2012). Darüber hinaus war es durch die erhöhte Viskosität nicht möglich, durch Zentrifugation einen zellfreien, klaren Kulturüberstand zur Produktabtrennung zu gewinnen.

Um die Probleme, welche durch die Produktion von EPS und Proteasen verursacht wurden, in den Griff zu bekommen, sollten die entsprechenden Gene im Genom von *P. polymyxa* DSM 292 identifiziert und deletiert werden. Zudem wurden weitere Zielgene zur Erzeugung sporulationsdefizienter Mutanten ausgewählt (siehe Tabelle 48). Um die ausgewählten Gene mittels CRISPR/Cas9 markerfrei zu entfernen, sollte das pCasPP-System von Rütering et al. (2017) verwendet werden. Als Kontrollen wurden die fertigen Plasmide pCasPP-*pepC* und pCasPP-*pepQ* (Lehrstuhl für Chemie biogener Rohstoffe, TUM) eingesetzt und neben *P. polymyxa* DSM 292 auch in den Stämmen DSM 365 und DSM 36^T angewendet. Im Stamm DSM 292 konnte keines der sieben Zielgene ausgeschaltet werden, während die Deletion von *pepC* und *pepQ* in DSM 365 mit der von Rütering et al. (2017) beschriebenen Effizienz gelang. Auch in DSM 36^T konnte eine Mutante nachgewiesen werden. Die phänotypische Untersuchung von *P. polymyxa* DSM 365 Δ *pepC* in Medium 2 zeigte eine geringere EPS-Produktion im Vergleich zu *P. polymyxa* DSM 292, was den Ergebnissen von Rütering et al. (2017) entspricht, und zeigt, dass *pepC* ein lohnendes Zielgen für *P. polymyxa*-Mutanten mit verringerter EPS-Produktion ist. Somit ist zu erwarten, dass die sekretorische Enzymproduktion mit einer Δ *pepC*-Mutante *P. polymyxa* DSM 292 im Bioreaktor deutlich effektiver wäre, insbesondere im Bezug auf die Aufbereitung des Zielenzym aus dem Kulturüberstand.

Bei der Gendeletion mittels CRISPR/Cas9 spielen die sgRNAs eine entscheidende Rolle. Die 20 nt des Protospacers definieren die Zielsequenz und somit die Schnittstelle. Insbesondere die 12 nt unmittelbar neben dem PAM (die sogenannte *seed*-Region) müssen exakt mit der Zielsequenz übereinstimmen, während Nichtübereinstimmungen im restlichen Teil des Protospacers nur einen relativ geringen Einfluss auf die Spezifität haben (Xiao et al., 2014). Somit ist es entscheidend, die Protospacer sorgfältig zu designen, um unspezifische Doppelstrangbrüche zu vermeiden. Wenn durch Cas9 Doppelstrangbrüche außerhalb der Zielsequenz erzeugt werden, ist die betroffene Zelle in der Regel nicht lebensfähig, da keine Vorlage zur Reparatur mittels homologer Rekombination vorhanden ist. Es ist anzunehmen, dass die Gendeletion in *P. polymyxa* DSM 292 in dieser Arbeit aufgrund von ungünstig ausgewählten Protospacer-Sequenzen nicht erfolgreich war. Ein Fehler beim Cas9-System selbst oder der Klonierung kann

weitgehend ausgeschlossen werden, da die fertigen Konstrukte mittels DNA-Sequenzierung kontrolliert wurden und die Kontrollversuche mit den *P. polymyxa*-Stämmen DSM 365 und DSM 36^T erfolgreich waren. In dieser Arbeit wurden die Protospacer-Sequenzen mittels CasOT (Xiao et al., 2014) ausgewählt, während Rütering et al. (2017) dafür die Software Benchling (<http://www.benchling.com>) verwendeten. Benchling bietet eine intuitive Benutzeroberfläche und berechnet für die möglichen Protospace-Sequenzen sowohl einen *on-target*- als auch *off-target*-Wert, der die Identifizierung der besten Protospacer-Sequenzen vereinfacht. Im Gegensatz dazu berechnet das kommandozeilenbasierte Programm CasOT lediglich die Anzahl an nichtübereinstimmenden Nucleotiden (*mismatch*) in allen möglichen unspezifischen Zielsequenzen (*off-targets*). Der Einfluss der Position der jeweiligen *mismatches* bleibt dabei weitestgehend unberücksichtigt, was das Design der sgRNAs erschwert. Um weitere Versuche zur Gendeletion mittels pCasPP in *P. polymyxa* DSM 292 durchzuführen, wäre es zukünftig sinnvoll, das Genom von *P. polymyxa* DSM 292 bei Benchling verfügbar machen zu lassen, um somit die Auswahl von effektiveren Protospacer-Sequenzen zu ermöglichen. Dass für das Design der sgRNAs stammspezifische Genomsequenzen benötigt werden, zeigt sich am Vergleich der Deletionseffizienz mittels pCasPP-*pepC* und pCasPP-*pepQ* bei Anwendung in den *P. polymyxa* Stämmen DSM 36^T, DSM 292 und DSM 365. Beim Stamm DSM 365, dessen Genom die Grundlage für das Design von pCasPP-*pepC* und pCasPP-*pepQ* war, lag die Deletionseffizienz bei 100 %, während sie bei den Stämmen DSM 36^T mit 8,3 % (1 von 12 getesteten Klonen positiv) und DSM 292 mit 0 % (keine *knock-out* Mutanten identifizierbar) deutlich niedriger war.

In dieser Arbeit wurde *P. polymyxa* DSM 292 erfolgreich als neuer Wirt für die sekretorische Produktion heterologer Glycosidhydrolasen etabliert. Dazu wurde ein neues, konjugativ übertragbares Expressionsplasmid entwickelt, welches sich einfach auf eine Vielzahl Gram-positiver Bakterien übertragen lässt. Die sekretorische Produktion der vier Zielenzyme Cel8A, Cel9D, Cel9R und Xgh74A aus *H. thermocellum* konnte gezeigt werden. Zur Optimierung der Produktionsleistung wurden für alle Zielgene SP-Bibliotheken durchmustert. Um die Produktion von Cel8A weiter zu erhöhen, wurden

zusätzlich der Promotor und das Kulturmedium optimiert. So konnte eine Steigerung der Cel8A-Aktivität im Überstand von anfangs etwa 30 U/l auf $5\,475 \pm 411$ U/l erzielt werden.

4.3 Ausblick

Rekombinante Enzyme stellen einen milliardenschweren Markt in der roten und weißen Biotechnologie dar. So betrug der Umsatz mit Enzymen für die Lebensmittel- und Futterindustrie, für Waschmittel und andere technische Enzyme im Jahr 2016 rund 5 Milliarden US-Dollar, mit Wachstumsprognosen von rund 25 % bis zum Jahr 2021 (Chapman et al., 2018). Für die Produktion neuer Enzyme stoßen die herkömmlichen Produktionsstämme inzwischen jedoch oft an ihre Grenzen. Um die wirtschaftliche Effizienz und Wettbewerbsfähigkeit biotechnologischer Prozesse zu verbessern, werden somit neue Produktionsstämme benötigt (Küppers et al., 2014). Dies trifft insbesondere für die Produktion heterologer Enzyme zu, da diese in etablierten *Bacillus*-Wirten oft nur mit geringer Ausbeute produziert und sekretiert werden, sodass sich die Aufmerksamkeit nun mehr und mehr auf andere Bakterien-Gattungen konzentriert (Freudl, 2018). Aber nicht nur für die industrielle Enzymproduktion, sondern auch für die Forschung sind neben den bereits etablierten Wirten neue, alternative Wirtsorganismen sehr wichtig, z.B. um ausreichende Mengen von Enzymen für biochemische oder strukturelle Untersuchungen zu erhalten oder um zu einem besseren Verständnis darüber zu kommen, warum viele Gene in heterologen Wirtsorganismen nicht gut exprimierbar sind.

Diese Arbeit legt einen Grundstein für die Erforschung und Etablierung neuer Stämme für die sekretorische Produktion heterologer Enzyme. Mit pBACOV und der dazugehörigen Methode zum Plasmidtransfer mittels triparentaler Konjugation wurde hier ein System entwickelt, das sich durch seine universelle Einsetzbarkeit über Gattungsgrenzen hinweg auszeichnet. So ist es auf der Suche nach neuen Produktionsstämmen nun möglich, mehrere interessante Stämme gleichzeitig auf ihre gentechnische Zugänglichkeit zu untersuchen und nach erfolgreichem Gentransfer erste Expressionsversuche zu starten, ohne aufwändige Transformationsprotokolle zu etablieren oder die Kandidatenstämme an die Laborbedingungen anzupassen. Dadurch bietet pBACOV einen allgemeinen, gentechnischen Zugang zu neuen Produktionsorganismen und kann einen Beitrag leisten, die biotechnologische Enzymproduktion in Zukunft effizienter zu gestalten.

pBACOV wurde in dieser Arbeit angewendet, um die sekretorische Produktion heterologer, thermophiler Glycosidhydrolasen in *P. polymyxa* DSM 292 zu etablieren. *P. polymyxa* DSM 292 zeigte dabei das Potenzial, zu einem leistungsstarken Produktionsorganismus entwickelt zu werden und ebnet den Weg zur Anwendung der bisher ungenutzten Gattung *Paenibacillus* für die Enzymproduktion. Trotz erheblichen Verbesserungen im Vergleich zur Ausgangslage zu Beginn dieser Arbeit sind die erreichten Enzymproduktivitäten im Kulturüberstand (bis ca. 0,35 g/l) noch weit unterhalb den für manche anderen Enzyme in etablierten *Bacillus*-Expressionswirten berichteten Werten (ca. 20 g/l). Werden die EPS-Produktion und die Produktion von Wirtsproteasen in diesem Stamm ausgeschaltet, ist aber zu erwarten, dass sich verschiedene Zielenzyme in *P. polymyxa* DSM 292 in signifikanten Mengen sekretorisch produzieren lassen. Durch den Fortschritt im Genom-Editing mittels CRISPR/Cas9 ist dieses Ziel in greifbarer Nähe. Anschließend könnte der so verbesserte Stamm zur Etablierung eines Verfahrens der Hochdichtefermentation eingesetzt werden, um die Zielenzyme im größeren Maßstab zu produzieren.

Somit liefert diese Arbeit zum einen mit pBACOV ein allgemein anwendbares Werkzeug, das die Etablierung neuer Produktionsorganismen für die Biotechnologie erleichtern wird. Zum anderen wurde dieses Werkzeug erfolgreich angewendet, um einen konkreten neuen Wirtsorganismus zu untersuchen und zu etablieren, welcher zukünftig für die sekretorische Enzymproduktion eingesetzt werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmann, D., Dorgan, J.R., 2007. Bioengineering for pollution prevention through development of biobased energy and materials state of the science report. *Ind. Biotechnol.* 3, 218–259. <https://doi.org/10.1089/ind.2007.3.218>
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A.A., Yu, Y.-K., 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272, 5101–5109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>
- Alzari, P.M., Souchon, H., Dominguez, R., 1996. The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*. *Structure* 4, 265–75.
- Anagnostopoulos, C., Spizizen, J., 1961. REQUIREMENTS FOR TRANSFORMATION IN *BACILLUS SUBTILIS*. *J. Bacteriol.* 81, 741–6.
- Aounallah, M.A., Slimene-Debez, I. Ben, Djebali, K., Gharbi, D., Hammami, M., Azaiez, S., Limam, F., Tabbene, O., 2016. Enhancement of Exochitinase Production by *Bacillus licheniformis* AT6 Strain and Improvement of N-Acetylglucosamine Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1–17. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2239-9>
- Ara, K., Ozaki, K., Nakamura, K., Yamane, K., Sekiguchi, J., Ogasawara, N., 2007. *Bacillus minimum* genome factory: effective utilization of microbial genome information. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 46, 169–78. <https://doi.org/10.1042/BA20060111>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bayer, E.A., Lamed, R., Himmel, M.E., 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 237–245. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2007.04.004>
- Béguin, P., Joliff, G., Juy, M., Amit, A.G., Millet, J., Poljak, R.J., Aubert, J.-P., 1988. Crystalline endoglucanase D of *Clostridium thermocellum* overproduced in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 160, 355–362. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60139-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60139-X)

- Bertani, G., 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 293–300.
- Bien, T.L.T., Tsuji, S., Tanaka, K., Takenaka, S., Yoshida, K., 2014. Secretion of heterologous thermostable cellulases in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 60, 175–182. <https://doi.org/10.2323/jgam.60.175>
- Blumer-Schuette, S.E., Brown, S.D., Sander, K.B., Bayer, E.A., Kataeva, I., Zurawski, J. V., Conway, J.M., Adams, M.W.W., Kelly, R.M., 2014. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 393–448. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12044>
- Boe, L., Gros, M.F., te Riele, H., Ehrlich, S.D., Gruss, A., 1989. Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* 171, 3366–3372.
- Böhm, M.-E., Huptas, C., Krey, V.M., Scherer, S., 2015. Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. *BMC Evol. Biol.* 15, 246. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0529-4>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T., Eggert, T., 2006. Systematic Screening of All Signal Peptides from *Bacillus subtilis*: A Powerful Strategy in Optimizing Heterologous Protein Secretion in Gram-positive Bacteria. *J. Mol. Biol.* 362, 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.034>
- Burkardt, H.-J., Riess, G., Pohler, A., 1979. Relationship of Group P1 Plasmids Revealed by Heteroduplex Experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 Are Identical. *J. Gen. Microbiol.* 114, 341–348. <https://doi.org/10.1099/00221287-114-2-341>
- Cantor, C.R., Schimmel, P.R., 1980. *Biophysical chemistry Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. W.H. Freeman, New York.
- Chapman, J., Ismail, A., Dinu, C., Chapman, J., Ismail, A.E., Dinu, C.Z., 2018. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* 8, 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Chen, J., Fu, G., Gai, Y., Zheng, P., Zhang, D., Wen, J., 2015. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression. *Microb. Cell Fact.* 14, 92. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0282-9>
- Cho, Y.-H., Song, J.Y., Kim, K.M., Kim, M.K., Lee, I.Y., Kim, S.B., Kim, H.S., Han, N.S., Lee, B.H., Kim, B.S., 2010. Production of nattokinase by batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *N. Biotechnol.* 27, 341–346.

<https://doi.org/10.1016/J.NBT.2010.06.003>

- Cobb, R.E., Wang, Y., Zhao, H., 2015. High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synth. Biol.* 4, 723–728. <https://doi.org/10.1021/sb500351f>
- Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M., 2014. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 2513–26. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J. V., Mann, M., 2011. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J. Proteome Res.* 10, 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>
- Creecy, J.P., Conway, T., 2015. Quantitative bacterial transcriptomics with RNA-seq. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 133–140. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2014.11.011>
- Dahl, M.K., Schmiedel, D., Hillen, W., 1995. Glucose and glucose-6-phosphate interaction with Xyl repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. *J. Bacteriol.* 177, 5467–72.
- Dawson, M.H., Sia, R.H., 1931. IN VITRO TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES: I. A TECHNIQUE FOR INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES IN VITRO. *J. Exp. Med.* 54, 681–699. <https://doi.org/10.1084/jem.54.5.681>
- de Hoon, M.J.L., Eichenberger, P., Vitkup, D., 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr. Biol.* 20, R735-45. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.031>
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- Degering, C., Eggert, T., Puls, M., Bongaerts, J., Evers, S., Maurer, K.-H., Jaeger, K.-E., 2010. Optimization of Protease Secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by Screening of Homologous and Heterologous Signal Peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6370–6376. <https://doi.org/10.1128/AEM.01146-10>
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D.R., 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 7347–51.

- Ely, B., 1985. Vectors for transposon mutagenesis of non-enteric bacteria. *MGG Mol. Gen. Genet.* 200, 302–304. <https://doi.org/10.1007/BF00425440>
- Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S., 2008. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS One* 3, e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- Ensinas, A.V., Codina, V., Maréchal, F., Albarelli, J., Silva, M.A., 2013. Thermo-Economic Optimization of Integrated First and Second Generation Sugarcane Ethanol Plant. *Chem. Eng. Trans.* 35, 523–528. <https://doi.org/10.3303/CET1335087>
- Errington, J., 1993. *Bacillus subtilis* Sporulation: Regulation of Gene Expression and Control of Morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 1–33.
- Espinosa, M., del Solar, G., Rojo, F., Alonso, J.C., 1995. Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 111–120. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07707.x>
- Fang, T.J., Liao, B.-C., Lee, S.-C., 2010. Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach. *N. Biotechnol.* 27, 25–32. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2009.09.008>
- Farhat-Khemakhem, A., Farhat, M. Ben, Boukhris, I., Bejar, W., Bouchaala, K., Kammoun, R., Maguin, E., Bejar, S., Chouayekh, H., 2012. Heterologous expression and optimization using experimental designs allowed highly efficient production of the PHY US417 phytase in *Bacillus subtilis* 168. *AMB Express* 2, 10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-10>
- Ferrari, E., Henner, D.J., Perego, M., Hoch, J.A., 1988. Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. *J. Bacteriol.* 170, 289–95.
- Figurski, D.H., Helinski, D.R., 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 1648–52.
- Fogarty, W.M., Griffin, P.J., 1973. Production and purification of the metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. *Appl. Microbiol.* 26, 185–90.
- Formal, S.B., Gemski, P., Baron, L.S., Labrec, E.H., Labrec, E.H., 1970. Genetic Transfer of *Shigella flexneri* Antigens to *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immun.* 1, 279–87.
- Freudl, R., 2018. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb. Cell Fact.* 17, 52. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0901-3>
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., Heitzer, M., Hegemann, P., 2004. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by

- using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol. Biol.* 55, 869–881. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-2150-6>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein Analysis Tools on the ExPASy Server 571–607. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in: John M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 571–607.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Görke, B., Stülke, J., 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z.-C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb. Cell Fact.* 15, 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Griffin, P.J., Fogarty, W.M., 1973. Physicochemical properties of the native, zinc- and manganese-prepared metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. *Appl. Microbiol.* 26, 191–5.
- Griffith, F., 1928. The Significance of Pneumococcal Types. *J. Hyg. (Lond.)* 27, 113–59. <https://doi.org/10.1017/s0022172400031879>
- Grottke, M., Rässler, S., 2003. Über Belegungs-, Couponsammler- und Komiteeprobleme, Diskussionspapier 49/2003 [WWW Document]. URL <http://www.grottke.de/documents/d0049.pdf> (accessed 6.20.18).
- Gruss, A., Ehrlich, S.D., 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 53, 231–241.
- Gryczan, T.J., Contente, S., Dubnau, D., 1978. Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 134, 318–29.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gustavsson, M., Lehtiö, J., Denman, S., Teeri, T.T., Hult, K., Martinelle, M., 2001. Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng.* 14, 711–5.
- Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F.R., 1991. [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204, 63–113.

[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-A](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-A)

- Harwood, C.R., 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol.* 10, 247–256. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(92\)90233-L](https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90233-L)
- Harwood, C.R., Cranenburgh, R.M., 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* 16, 73–9. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.001>
- Häßler, T., Schieder, D., Pfaller, R., Faulstich, M., Sieber, V., 2012. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bioresour. Technol.* 124, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.047>
- Heinze, S., Kornberger, P., Grätz, C., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., Liebl, W., 2018a. Transmating: conjugative transfer of a new broad host range expression vector to various *Bacillus* species using a single protocol. *BMC Microbiol.* 18, 56. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1198-4>
- Heinze, S., Lagkouvardos, I., Liebl, W., Schwarz, W.H., Kornberger, P., Zverlov, V. V., 2020. Draft Genome Sequence of *Paenibacillus polymyxa* DSM 292, a Gram-Positive, Spore-Forming Soil Bacterium with High Biotechnological Potential. *Microbiol. Resour. Announc.* 9. <https://doi.org/10.1128/mra.00071-20>
- Heinze, S., Mechelke, M., Kornberger, P., Liebl, W., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., 2017. Identification of endoxylanase XynE from *Clostridium thermocellum* as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. *Sci. Rep.* 7, 11178. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11598-y>
- Heinze, S., Zimmermann, K., Ludwig, C., Heinzlmeir, S., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., Liebl, W., Kornberger, P., 2018b. Evaluation of promoter sequences for the secretory production of a *Clostridium thermocellum* cellulase in *Paenibacillus polymyxa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9369-7>
- Hemmerich, J., Rohe, P., Kleine, B., Jurischka, S., Wiechert, W., Frendl, R., Oldiges, M., 2016. Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Fact.* 15, 208. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0604-6>
- Hertel, R., Volland, S., Liesegang, H., 2015. Conjugative reporter system for the use in *Bacillus licheniformis* and closely related Bacilli. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 162–7. <https://doi.org/10.1111/lam.12352>
- Hou, X., Yu, X., Du, B., Liu, K., Yao, L., Zhang, S., Selin, C., Fernando, W.G.D., Wang, C., Ding, Y., 2016. A single amino acid mutation in Spo0A results in sporulation deficiency of *Paenibacillus polymyxa* SC2. *Res. Microbiol.* 167, 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.05.002>

- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., Zhang, F., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Huptas, C., Scherer, S., Wenning, M., 2016. Optimized Illumina PCR-free library preparation for bacterial whole genome sequencing and analysis of factors influencing de novo assembly. *BMC Res. Notes* 9, 269. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2072-9>
- Ingram, L.C., Richmond, M.H., Sykes, R.B., 1973. Molecular Characterization of the R Factors Implicated in the Carbenicillin Resistance of a Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burns. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3, 279–288. <https://doi.org/10.1128/AAC.3.2.279>
- Jain, A., Srivastava, P., 2013. Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* 348, 87–96. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12241>
- Jan, J., Valle, F., Bolivar, F., Merino, E., 2000. Characterization of the 5' subtilisin (aprE) regulatory region from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 9–14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08926.x>
- Johnson, C.M., Grossman, A.D., 2016. The Composition of the Cell Envelope Affects Conjugation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 198, 1241–9. <https://doi.org/10.1128/JB.01044-15>
- Johnson, E.M., Baron, L.S., 1969. Genetic transfer of the Vi antigen from *Salmonella typhosa* to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 99, 358–9.
- Joliff, G., Béguin, P., Aubert, J.P., 1986. Nucleotide sequence of the cellulase gene *celD* encoding endoglucanase D of *Clostridium thermocellum*. *Nucleic Acids Res.* 14, 8605–13. <https://doi.org/10.1093/nar/14.21.8605>
- Joliff, G., Edelman, A., Klier, A., Rapoport, G., 1989. Inducible Secretion of a Cellulase from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2739–44.
- Keggins, K.M., Lovett, P.S., Duvall, E.J., 1978. Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus DNA* in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 1423–7.
- Knight, B.C.J.G., Proom, H., 1950. A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 4, 508–38. <https://doi.org/10.1099/00221287-4-3-508>
- Kontinen, V., Sarvas, M., 1999. Bacteria genetically engineered to produce greater than wild-type amounts of prsa protein involved in protein secretion; for enhanced secretion of hyperexpressed homologous and heterologous proteins. US Patent

5945278.

- Kontinen, V.P., Sarvas, M., 1993. The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion. *Mol. Microbiol.* 8, 727–737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01616.x>
- Korneli, C., Bolten, C.J., Godard, T., Franco-Lara, E., Wittmann, C., 2012. Debottlenecking recombinant protein production in *Bacillus megaterium* under large-scale conditions--targeted precursor feeding designed from metabolomics. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1538–50. <https://doi.org/10.1002/bit.24434>
- Kostner, D., Rachinger, M., Liebl, W., Ehrenreich, A., 2017. Markerless deletion of putative alanine dehydrogenase genes in *Bacillus licheniformis* using a codBA-based counterselection technique. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000544>
- Küppers, T., Steffen, V., Hellmuth, H., O'Connell, T., Bongaerts, J., Maurer, K.-H., Wiechert, W., 2014. Developing a new production host from a blueprint: *Bacillus pumilus* as an industrial enzyme producer. *Microb. Cell Fact.* 13, 46. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-46>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–5.
- Lederberg, J., Tatum, E.L., 1946. Gene Recombination in *Escherichia Coli*. *Nature* 158, 558–558. <https://doi.org/10.1038/158558a0>
- Leis, B., Held, C., Bergkemper, F., Dennemarck, K., Steinbauer, R., Reiter, A., Mechelke, M., Moerch, M., Graubner, S., Liebl, W., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., 2017. Comparative characterization of all cellulosomal cellulases from *Clostridium thermocellum* reveals high diversity in endoglucanase product formation essential for complex activity. *Biotechnol. Biofuels* 10, 240. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0928-4>
- Li, W., Zhou, X., Lu, P., 2004. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* 155, 605–610. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.05.002>
- Lin, Y.-L., Blaschek, H.P., 1984. Transformation of Heat-Treated *Clostridium acetobutylicum* Protoplasts with pUB110 Plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 737–42.
- Linder, M., Teeri, T.T., 1997. The roles and function of cellulose-binding domains. *J. Biotechnol.* 57, 15–28. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00087-4)
- Liu, J.-M., Xin, X.-J., Li, C.-X., Xu, J.-H., Bao, J., 2012. Cloning of thermostable cellulase genes of *Clostridium thermocellum* and their secretive expression in *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 652–662.

<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9456-z>

- Logan, N.A., Vos, P. De, 2015. *Bacillus*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–163. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Loy, A., Schulz, C., Lücker, S., Schöpfer-Wendels, A., Stoecker, K., Baranyi, C., Lehner, A., Wagner, M., 2005. 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order “*Rhodocyclales*.” *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1373–86. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1373-1386.2005>
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., 2009. Taxonomic outline of the phylum Firmicutes, in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer New York, pp. 15–17. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_2
- Lynd, L.R., Grethlein, H.E., Wolkin, R.H., 1989. Fermentation of Cellulosic Substrates in Batch and Continuous Culture by *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3131–9.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–77, table of contents. <https://doi.org/10.1128/mubr.66.3.506-577.2002>
- Malten, M., Hollmann, R., Deckwer, W.-D., Jahn, D., 2005. Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 206–218. <https://doi.org/10.1002/bit.20341>
- McCleary, B. V., 1980. New chromogenic substrates for the assay of alpha-amylase and (1→4)-β-d-glucanase. *Carbohydr. Res.* 86, 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84584-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84584-X)
- Michna, R.H., Zhu, B., Mäder, U., Stülke, J., 2016. SubtiWiki 2.0--an integrated database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 44, D654-62. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1006>
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mougiakos, I., Bosma, E.F., de Vos, W.M., van Kranenburg, R., van der Oost, J., 2016. Next Generation Prokaryotic Engineering: The CRISPR-Cas Toolkit. *Trends Biotechnol.* 34, 575–587. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2016.02.004>
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a

- polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- 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, 245–54. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.003>
- Narasimhan, A., Shivakumar, S., 2012. Optimization of chitinase produced by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* using Plackett-Burman design. *Eur. J. Exp. Biol.* 2, 861–865.
- Nerurkar, M., Joshi, M., Adivarekar, R., 2015. Bioscouring of Cotton using Lipase from Marine Bacteria *Bacillus sonorensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 253–265. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1259-6>
- Nicolas, P., Mader, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E.L., Fogg, M.J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Hartig, E., Harwood, C.R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le Chat, L., Lecointe, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R.A.T., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rugheimer, F., Sappa, P.K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stulke, J., Wiegert, T., Devine, K.M., Wilkinson, A.J., Maarten van Dijl, J., Hecker, M., Volker, U., Bessieres, P., Noirot, P., 2012. Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* (80-.). 335, 1103–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1206848>
- Pansegrau, W., Balzer, D., Kruft, V., Lurz, R., Lanka, E., 1990. In vitro assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6555–6559. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6555>
- Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P.T., Figurski, D.H., Guiney, D.G., Haas, D., Helinski, D.R., Schwab, H., Stanisich, V.A., Thomas, C.M., 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *J. Mol. Biol.* 239, 623–63. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1404>
- Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S., 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24, 79–88. <https://doi.org/10.1038/nbt1172>
- Peng, J., Wang, W., Jiang, Y., Liu, M., Zhang, H., Shao, W., 2011. Enhanced Soluble Expression of a Thermostable Cellulase from *Clostridium thermocellum* in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 63, 523–530. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0012-4>
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>

- Pohl, S., Bhavsar, G., Hulme, J., Bloor, A.E., Misirli, G., Leckenby, M.W., Radford, D.S., Smith, W., Wipat, A., Williamson, E.D., Harwood, C.R., Cranenburgh, R.M., 2013. Proteomic analysis of *Bacillus subtilis* strains engineered for improved production of heterologous proteins. *Proteomics* 13, 3298–3308. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300183>
- Pohl, S., Harwood, C.R., 2010. Heterologous protein secretion by bacillus species. From the cradle to the grave, *Advances in Applied Microbiology*. San Diego. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)73001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)73001-X)
- Rachinger, M., Bauch, M., Strittmatter, A., Bongaerts, J., Evers, S., Maurer, K.-H., Daniel, R., Liebl, W., Liesegang, H., Ehrenreich, A., 2013. Size unlimited markerless deletions by a transconjugative plasmid-system in *Bacillus licheniformis*. *J. Biotechnol.* 167, 365–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.026>
- Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R., 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3116–20.
- Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W.A., Pohl, H.-D., Korz, D., Sanders, E.A., Roß, A., Deckwer, W.-D., 1991. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* 20, 17–27. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90032-Q](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90032-Q)
- Rudolph, B., Gebendorfer, K.M., Buchner, J., Winter, J., 2010. Evolution of *Escherichia coli* for Growth at High Temperatures. *J. Biol. Chem.* 285, 19029. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.103374>
- Ruf, A., Stihle, M., Benz, J., Schmidt, M., Sobek, H., 2013. Structure of Gentlyase, the neutral metalloprotease of *Paenibacillus polymyxa*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 69, 24–31. <https://doi.org/10.1107/S0907444912041169>
- Rütering, M., Cress, B.F., Schilling, M., Rühmann, B., Koffas, M.A.G., Sieber, V., Schmid, J., 2017. Tailor-made exopolysaccharides—CRISPR-Cas9 mediated genome editing in *Paenibacillus polymyxa*. *Synth. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysx007>
- Rütering, M., Schmid, J., Rühmann, B., Schilling, M., Sieber, V., 2016. Controlled production of polysaccharides—exploiting nutrient supply for levan and heteropolysaccharide formation in *Paenibacillus* sp. *Carbohydr. Polym.* 148, 326–334. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.04.074>
- Rygas, T., Hillen, W., 1991. Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 594–599. <https://doi.org/10.1007/BF00169622>

- Sawhney, N., Crooks, C., Chow, V., Preston, J.F., St John, F.J., 2016. Genomic and transcriptomic analysis of carbohydrate utilization by *Paenibacillus* sp. JDR-2: systems for bioprocessing plant polysaccharides. *BMC Genomics* 17, 131. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2436-5>
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.H., Pühler, A., 1990. High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* 172, 1663–6.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50, 1–17.
- Schanzenbach, C., Schmidt, F.C., Breckner, P., Teese, M.G., Langosch, D., 2017. Identifying ionic interactions within a membrane using BLaTM, a genetic tool to measure homo- and heterotypic transmembrane helix-helix interactions. *Sci. Rep.* 7, 43476. <https://doi.org/10.1038/srep43476>
- Schumann, W., 2007. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 62, 137–89. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)62006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)62006-1)
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M., 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>
- Schwarz, W.H., 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 634–649.
- Schwarz, W.H., Gräbnitz, F., Staudenbauer, W.L., 1986. Properties of a *Clostridium thermocellum* Endoglucanase Produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1293–1299.
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J., 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055–3063. <https://doi.org/10.1021/bi00740a018>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V, Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539–539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C.K.M., 2017.

- Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Front. Microbiol.* 7, 2087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A., 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 30, 225–420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
- Solovyev, V., Salamov, A., 2011. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences, in: Li, R.W. (Ed.), *Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Nova Science Publishers, New York, pp. 61–78.
- Song, B.-H., Neuhard, J., 1989. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. *MGG Mol. Gen. Genet.* 216, 462–468. <https://doi.org/10.1007/BF00334391>
- Song, Y., Nikoloff, J.M., Fu, G., Chen, J., Li, Q., Xie, N., Zheng, P., Sun, J., Zhang, D., 2016. Promoter Screening from *Bacillus subtilis* in Various Conditions Hunting for Synthetic Biology and Industrial Applications. *PLoS One* 11, e0158447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158447>
- Song, Y., Nikoloff, J.M., Zhang, D., 2015. Improving Protein Production on the Level of Regulation of both Expression and Secretion Pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 963–977. <https://doi.org/10.4014/jmb.1501.01028>
- Sonnleitner, B., Chmiel, H., 2011. Wachstum: Kinetik und Prozessführung, in: *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 99–149. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2477-8_4
- Soutschek-Bauer, E., Staudenbauer, W.L., 1987. Synthesis and secretion of a heat-stable carboxymethylcellulase from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*. *Mol. Gen. Genet.* 208, 537–41.
- Spizizen, J., 1958. TRANSFORMATION OF BIOCHEMICALLY DEFICIENT STRAINS OF *BACILLUS SUBTILIS* BY DEOXYRIBONUCLEATE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44, 1072–8.
- Stammen, S., Müller, B.K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E., Jahn, D., 2010. High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4037–46. <https://doi.org/10.1128/AEM.00431-10>
- Teather, R.M., Wood, P.J., 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 777–80.
- The UniProt Consortium, 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47, D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>

- Tominaga, Y., Ohshiro, T., Suzuki, H., 2016. Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* is a versatile approach for genetic transformation of thermophilic *Bacillus* and *Geobacillus* species. *Extremophiles* 20, 375–81. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0819-9>
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P., Courvalin, P., 1987. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 48, 289–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02558.x>
- Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Šoštarić, N., Economou, A., Karamanou, S., 2017. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 21–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.161>
- Viljoen, J.A., Fred, E.B., Peterson, W.H., 1926. The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. *J. Agric. Sci.* 16, 1–17. <https://doi.org/10.1017/S0021859600088249>
- Wang, P.-Z., Doi, R.H., 1984. Overlapping Promoters transcribed by *Bacillus subtilis* sigma55 and sigma37 RNA Polymerase Holoenzymes during Growth and Stationary phases. *J. Biol. Chem.* 259, 8619–25.
- Wang, W., Malcolm, B.A., 1999. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 26, 680–2.
- Wang, Z., Chen, T., Ma, X., Shen, Z., Zhao, X., 2011. Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of *zwf* and *gnd* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour. Technol.* 102, 3934–3940. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.11.120>
- Wenzel, M., Müller, A., Siemann-Herzberg, M., Altenbuchner, J., 2011. Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6419–6425. <https://doi.org/10.1128/AEM.05219-11>
- Westers, L., Westers, H., Quax, W.J., 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.011>
- Wittchen, K.-D., Strey, J., Bültmann, A., 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.
- Wood, T.M., Bhat, K.M., 1988. Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol.* 160, 87–112. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60109-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60109-1)
- Wu, S., Yeung, J.C., Duan, Y., Ye, R., Szarka, S.J., Habibi, H.R., Wong, S., 2002.

- Functional Production and Characterization of a Fibrin-Specific Single-Chain Antibody Fragment from 68, 3261–3269. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3261>
- Wu, S.C., Ye, R., Wu, X.C., Ng, S.C., Wong, S.L., 1998. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *J. Bacteriol.* 180, 2830–5.
- Xiao, A., Cheng, Z., Kong, L., Zhu, Z., Lin, S., Gao, G., Zhang, B., 2014. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics* 30, 1180–1182. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt764>
- Xue, G.-P., Johnson, J.S., Dalrymple, B.P., 1999. High osmolarity improves the electrotransformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J. Microbiol. Methods* 34, 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00087-6)
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., Xu, Y., 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 40, W445–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gks479>
- Young, M., Minton, N.P., Staudenbauer, W.L., 1989. Recent advances in the genetics of the clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* 63, 301–325. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03402.x>
- Yu, X., Xu, J., Liu, X., Chu, X., Wang, P., Tian, J., Wu, N., Fan, Y., 2015. Identification of a highly efficient stationary phase promoter in *Bacillus subtilis*. *Sci. Rep.* 5, 18405. <https://doi.org/10.1038/srep18405>
- Zhang, J.-H., Chung, D.Y., Oldenburg, K.R., 1999. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* 4, 67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>
- Zhang, M., Shi, M., Zhou, Z., Yang, S., Yuan, Z., Ye, Q., 2006. Production of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase in *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5) fed with partially hydrolyzed starch. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 555–560. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2006.01.011>
- Zhang, X., Tu, B., Dai, L., Lawson, P.A., Zheng, Z., Liu, L.-Y., Deng, Y., Zhang, H., Cheng, L., 2018. *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new Hungateiclostridiaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 3197–3211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002966>
- Zverlov, V. V., Kellermann, J., Schwarz, W.H., 2005a. Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: Identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics* 5, 3646–3653. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401199>

- Zverlov, V. V, Schantz, N., Schmitt-Kopplin, P., Schwarz, W.H., 2005b. Two new major subunits in the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: xyloglucanase Xgh74A and endoxylanase Xyn10D. *Microbiology* 151, 3395–3401. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28206-0>
- Zverlov, V. V, Schantz, N., Schwarz, W.H., 2005c. A major new component in the cellulosome of *Clostridium thermocellum* is a processive endo-beta-1,4-glucanase producing cellotetraose. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.037>

ANHÄNGE

A1 Referenzkurve für den Azo-CMC-Test

Zur Auswertung der Aktivitätstests mittels Azo-CMC-Test (Kapitel 2.7.7) wurde eine Referenzkurve mit definierten Konzentrationen an gereinigtem Cel8A (Referenzprotein aus *E. coli*) erstellt. Die Messwerte und die Referenzkurve sind in Tabelle 50 bzw. Abbildung 34 dargestellt.

Tabelle 50: Eingesetzte Cel8A-Konzentrationen und Messwerte der Cel8A-Referenzkurve für den Azo-CMC-Test (Inkubation: 5 min bei 60 °C). Drei Replikate pro Cel8A-Konzentration

C (CEL8A) [µG/ML]	REPLIKAT	E ₅₉₀ [-]	MITTELWERT E ₅₉₀ [-]	STANDARDABWEICHUNG [-]
3,9	1	0,132	0,121	0,01002354
	2	0,112		
	3	0,119		
7,8	1	0,471	0,422	0,05409304
	2	0,431		
	3	0,364		
11,7	1	0,637	0,610	0,02908418
	2	0,579		
	3	0,614		
15,6	1	0,896	0,820	0,06870728
	2	0,762		
	3	0,803		
19,5	1	1,086	1,019	0,0740787
	2	0,939		
	3	1,031		
23,4	1	1,335	1,252	0,07742519
	2	1,182		
	3	1,239		
31,2	1	1,589	1,480	0,09635084
	2	1,405		
	3	1,447		
39,0	1	1,652	1,421	0,20272499
	2	1,273		
	3	1,337		
52,0	1	1,642	1,488	0,14298129
	2	1,360		
	3	1,462		
58,5	1	1,570	1,475	0,08342601
	2	1,413		
	3	1,443		

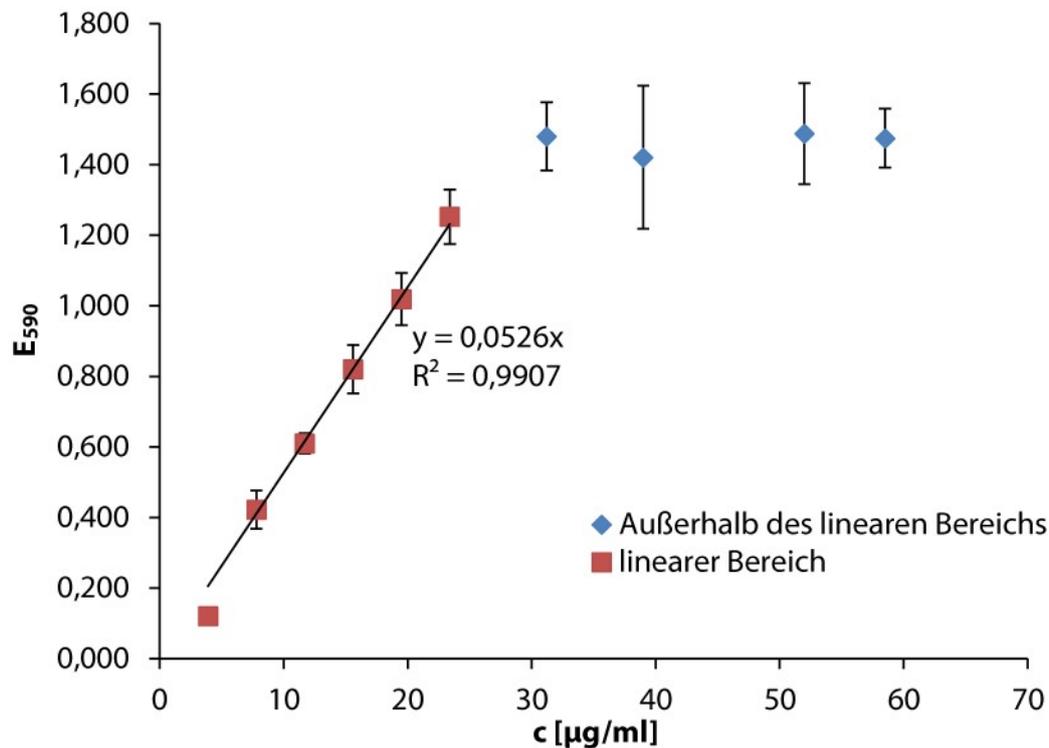


Abbildung 34: Referenzkurve für den Azo-CMC-Test. Rote Quadrate kennzeichnen die Messpunkte des linearen Bereichs, blaue Rauten stellen die weiteren Messpunkte der Referenzkurve außerhalb des linearen Bereichs dar. Die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression (nur Messpunkte des linearen Bereichs) sind angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen ± 1 Standardabweichung (3 Replikate).

Die Auswertung ergab, dass der Azo-CMC-Test in einem Bereich bis zu 23,4 µg/ml Cel8A linear verläuft ($R^2 = 0,9907$). Dies entspricht einer gemessenen E_{590} von bis zu 1,25. Wurden während der Analyse von Kulturüberständen (oder anderer Proben) Messwerte $> 1,2$ erhalten, wurden die Überstände entsprechend verdünnt und der Test wiederholt.

Die spezifische CMCase-Aktivität des Referenz-Cel8A betrug 15,75 U/mg (ermittelt mit dem DNSA-Test). Unter Berücksichtigung dieses Werts, des eingesetzten Probenvolumens (150 µl) und ggf. des Verdünnungsfaktors konnten die Probenergebnisse (E_{590}) anhand der Steigung der Regressionsgeraden (Abbildung 34) in spezifische Aktivität [U/ml] umgerechnet werden.

A2 Berechnungen zur Abdeckung aller SPs in einer Bibliothek

Die Berechnung der benötigten Anzahl an Kolonien, um alle 173 SPs einer SP-Bibliothek vollständig abzudecken (Kap. 3.2.3), erfolgte mittels der Formel für das sogenannte Sammelbilderproblem. Unter der Annahme, dass alle SPs gleich wahrscheinlich auftreten, gilt für A (= die erwartete benötigte Anzahl an Kolonien für eine vollständig abgedeckte SP-Bibliothek mit n verschiedenen SPs):

$$\begin{aligned} A &= \frac{n}{1} + \frac{n}{2} + \dots + \frac{n}{n-2} + \frac{n}{n-1} + \frac{n}{n} = \\ &= n \times \left(\frac{1}{1} + \frac{1}{2} + \dots + \frac{1}{n-2} + \frac{1}{n-1} + \frac{1}{n} \right) = \\ &= n \times \sum_{k=1}^n \frac{1}{k} \end{aligned}$$

Dabei ist $\sum_{k=1}^n \frac{1}{k}$ die n -te Partialsumme der Harmonischen Reihe H_n , die mit folgender Näherungsformel gelöst werden kann:

$$H_n = \sum_{k=1}^n \frac{1}{k} = \ln n + \gamma \approx \ln n + 0,5772$$

Bei γ handelt es sich um die Euler-Mascheroni-Konstante mit einem Näherungswert von 0,5772. Somit lässt sich E wie folgt abschätzen:

$$A \approx n(\ln n + 0,5772)$$

Für $n = 173$ SPs kann also ab einer Anzahl von $A = 992$ Kolonien eine vollständige Abdeckung der Bibliothek erwartet werden.

Zur Berechnung, wie viele SPs in den unvollständigen SP-Bibliotheken von *cel8A* Bib1 (208 Kolonien) und *cel9R* (935 Kolonien) erwartet werden können, greift das sogenannte Belegungsproblem aus der Wahrscheinlichkeitsrechnung. In einem Diskussionspapier der Universität Erlangen-Nürnberg leiten Grottke & Rässler (2003) folgende Gleichung zur Lösung des Erwartungswertes E für U_x her, wobei U_x die Anzahl unterschiedlicher

„Treffer“ ($\hat{=}$ in der Bibliothek abgedeckte SP) nach x Versuchen ($\hat{=}$ erhaltene Kolonien) bezeichnet:

$$E(U_x) = n \times \left[1 - \left(1 - \frac{1}{n} \right)^x \right]$$

Mit der Anzahl der möglichen Signalpeptide $n = 173$ lassen sich für die SP-Bibliotheken von *cel8A* und *cel9R* die jeweilige erwartete Anzahl verschiedener SPs berechnen. Für *cel8A* ist $x = 208$. Es ergibt sich:

$$\begin{aligned} E(U_x) &= n \times \left[1 - \left(1 - \frac{1}{n} \right)^x \right] = \\ &= 173 \left[1 - \left(1 - \frac{1}{173} \right)^{208} \right] \approx 121 \end{aligned}$$

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die SP-Bibliothek von *cel8A* mit 208 Kolonien etwa 121 verschiedene SPs enthielt. Analog ergibt sich für die *cel9R*-SP-Bibliothek mit $x = 935$ ein Erwartungswert von rund 172, was einer beinahe vollständigen Abdeckung entspricht.

A3 Berechnungen mittels CasOT zur Auswahl der sgRNAs

Die Berechnungen zur Überprüfung der Kriterien 3 und 5 zur Auswahl der sgRNAs (siehe Kapitel 3.2.9) wurden mit CasOT (Xiao et al., 2014) durchgeführt. CasOT gibt für jede mögliche sgRNA das Ergebnis in folgendem Format an: „Axy n“. der Buchstabe A zeigt an, dass das PAM die Sequenz NGG aufweist. Die Zahl x gibt die Anzahl an Nichtübereinstimmungen in der *seed*-Region an, die Zahl y die Anzahl an Nichtübereinstimmungen im rest des Protospacers. Die Zahl n zeigt an, an wie viele Stellen im Genom die Bedingung „Axy“ erfüllt ist. Beispielsweise bedeutet „A00 1“, dass es im Genom eine einzige Stelle mit 0 Nichtübereinstimmungen im *seed* und im Rest des Protospacers gibt. Die exakte Sequenz Protospacers ist also im gesamten Genom genau einmal zu finden, die sgRNA ist somit spezifisch. „A24 2“ bedeutet demnach, dass es

zwei Stellen im Genom gibt, an denen die Sequenz der gewählten sgRNA mit 2 Nichtübereinstimmungen im *seed* und 4 Nichtübereinstimmungen im restlichen Protospacer zu finden ist. Die Position der Nichtübereinstimmungen innerhalb des Protospacers wird dabei nicht angegeben.

Tabelle 51 stellt für die ausgewählten sgRNAs die CasOT-Ergebnisse sowie die Bewertung hinsichtlich der Kriterien 1-4 aus Kapitel 3.2.9 dar.

Tabelle 51: Bewertung der einzelnen ausgewählten sgRNAs hinsichtlich der in Kapitel 3.2.9 festgelegten Kriterien 1-5.

ZIELGEN	NAME SGRNA	ERGEBNIS CASOT		KRITERIUM ERFÜLLT?			
		= KRITERIUM 5		KRIT. 1	KRIT. 2	KRIT. 3	KRIT. 4
spoIV	spoIV_sg1	A00	1	Nein (3/4)	Ja	Ja	Ja
		A24	2				
		A25	5				
		A26	5				
		A27	4				
		A28	2				
spoIV	spoIV_sg2	A00	1	Nein (2/4)	Ja	Ja	Nein (282 bp vom Stop-Codon)
		A25	3				
		A26	2				
		A27	3				
		A28	1				
spo0A	spo0A_sg1	A00	1	Nein (2/4)	Nein	Ja	Ja (44 bp vom Stop-Codon)
		A23	1				
		A25	5				
		A26	7				
		A27	5				
		A28	5				
spo0A	spo0A_sg2	A00	1	Nein (3/4)	Ja	Ja	Nein (206 bp vom Start-Codon)
		A23	1				
		A24	2				
		A25	6				
		A26	10				
		A27	6				
		A28	2				
sigF2	sigF2_sg1	A00	1	Nein (3/4)	Ja	Ja	Nein (145 bp vom Start-Codon)
		A24	5				
		A25	5				
		A26	6				
		A27	3				
		A28	8				

Anhänge

sigF2	sigF2_sg2	A00	1	Nein (2/4)	Nein	Ja	Ja (67 bp vom Stop-Codon)
		A23	1				
		A24	3				
		A25	8				
		A26	7				
		A27	6				
		A28	3				
npr2 und npr1+2, je nach Flanken für die homologe Rekombination	npr2_sg1	A00	1	Nein (3/4)	Ja	Ja	Nein (121 bp von homologer Flanke, 113 bp vom Start- Codon)
		A22	1				
		A23	2				
		A24	1				
		A25	8				
		A26	5				
		A27	5				
A28	2						
npr2 und npr1+2, je nach Flanken für die homologe Rekombination	npr2_sg2	A00	1	Nein (2/4)	Ja	Ja	Nein (104 bp vom Stop-Codon)
		A24	2				
		A25	6				
		A26	5				
		A27	7				
A28	3						
npr1+2	npr1_sg1	A00	1	Nein (3/4)	Ja	Ja	Nein (120 bp vom Stop-Codon)
		A23	1				
		A24	1				
		A25	3				
		A26	3				
		A27	4				
A28	3						
npr1+2	npr1_sg2	A00	1	Nein (2/4)	Ja	Ja	Nein (230 bp vom Stop-Codon)
		A24	1				
		A25	3				
		A26	4				
		A27	4				
