Charakterisierung des Regulators ManR und die Anwendung des Mannose Expressionssystems in *Bacillus subtilis*

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik (Fakultät 4) der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Marian Wenzel

aus Kirchheim unter Teck

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Mattes

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Jendrossek

Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 2013

Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart

2013

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die von mir ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Übernommenes Gedankengut wurde von mir als solches kenntlich gemacht.

Marian Wenzel

›› Man würde nie etwas entdecken,
wenn man sich schon mit dem zufrieden gäbe,
was bereits entdeckt wurde. ‹‹

L. A. SENECA

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **VII**

Abkürzungsverzeichnis ..... **XI**

Zusammenfassung **1**

Summary **3**

1 Einleitung **5**

1.1 *Bacillus subtilis* 5

1.1.1 Systematik, Morphologie und Physiologie 5

1.1.2 Genetische Eigenschaften 7

1.1.3 Biotechnologische Bedeutung 8

1.2 Regulation des Kohlenstoffmetabolismus 10

1.2.1 Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem 10

1.2.2 HPr, Crh und die HPr-Kinase/Phosphatase 12

1.2.3 Der globale Regulator CcpA 12

1.2.4 PRD-haltige Transkriptionsregulatoren 13

1.2.5 Die Katabolitrepression am Beispiel von MtlR aus *B. subtilis* 15

1.3 Die Rolle der globalen Regulatoren CodY und TnrA 17

1.4 Das D-Mannose-Expressionssystem 21

1.4.1 Das *manPA-yjdF* Operon aus *B. subtilis* 21

1.4.2 Der Transkriptionsaktivator ManR 22

1.4.3 Anwendbarkeit in der Hochzelldichtefermentation 24

1.5 Die Hochzelldichtefermentation 25

1.6 Zielsetzungen 28

2 Material und Methoden **29**

2.1 Bakterienstämme und Plasmide 29

2.1.1 Bakterienstämme 29

2.1.2 Plasmide 30

2.2 Materialien 38

2.2.1 Chemikalien 38

2.2.2 Enzyme 38

2.2.3 Kits 39

2.2.4 Oligonukleotide ... 39
2.2.5 Medien ... 44
2.2.6 Antibiotika und andere Medienzusätze ... 45
2.2.7 Puffer und Lösungen ... 46
2.3 Mikrobiologische Methoden ... 49
2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung ... 49
2.3.2 Bestimmung der optischen Dichte ... 49
2.3.3 Transformation von *E. coli* ... 49
2.3.4 Transformation von *B. subtilis* ... 50
2.3.5 Genexpression in *E. coli* JM109 ... 51
2.3.6 Genexpression in *B. subtilis* ... 51
2.3.7 Plasmidstabilitätstest ... 51
2.4 Molekulargenetische Methoden ... 52
2.4.1 Plasmidisolierung ... 52
2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 53
2.4.3 Kolonie-PCR ... 54
2.4.4 *Overlap Extension*-PCR ... 54
2.4.5 Agarosegelelektrophorese ... 55
2.4.6 DNA-Konzentrationsbestimmung ... 56
2.4.7 Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten ... 56
2.4.8 Isopropanolfällung ... 57
2.4.9 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase ... 57
2.4.10 Behandlung mit Klenow Enzym ... 57
2.4.11 Ligation ... 58
2.4.12 Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis* ... 58
2.4.13 DNA-Sequenzierung ... 58
2.4.14 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode ... 58
2.4.15 Markerfreie chromosomale Deletionen in *B. subtilis* ... 59
2.4.16 DNase I Footprinting Assay ... 61
2.5 Proteinbiochemische Methoden ... 62
2.5.1 Zellaufschluss und Herstellung von Protein-Rohextrakten ... 62
2.5.2 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie ... 62
2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford ... 63
2.5.4 ManR-Aktivierungsassay ... 63

2.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 64
2.5.6 Gelmobilityshift Assay ... 65
2.5.7 Bestimmung von K_D und k_{diss} ... 65
2.5.8 β-Galaktosidase Assay ... 66
2.5.9 Spektrophotometrische Fluoreszenzmessungen ... 67
2.6 Fed-Batch-Fermentationen mit *B. subtilis* TQ356 ... 68
2.6.1 Anzucht der Vorkulturen ... 68
2.6.2 Fed-Batch-Fermentation im 30 L-Bioreaktor ... 68
2.6.3 Bestimmung der Biotrockenmasse ... 69
2.6.4 Online-Fluoreszenzmessung im Bioreaktor ... 70
3 Ergebnisse ... 71
3.1 Analyse der Promotorregionen P_{manR} und P_{manP} ... 71
3.1.1 Sequenzbasierte Analyse und Modifikation der Promotorregionen ... 71
3.1.2 Aufklärung der unterschiedlichen Expressionsniveaus ... 73
3.2 Bestimmung der ManR-Bindestellen ... 76
3.2.1 Produktion von ManR in *B. subtilis* TQ356 ... 76
3.2.2 Produktion von ManR in *E. coli* JM109 ... 77
3.2.3 In *B. subtilis* und *E. coli* produziertes ManR zeigt unterschiedliche DNA-Bindeaktivität ... 78
3.2.4 Aktivierung von ManR ... 80
3.2.5 Bestimmung der DNA-Bindeeigenschaften von ManR ... 82
3.2.6 DNase I Footprinting Experimente ... 84
3.2.7 Künstlicher Hybridpromotor deutet auf Klasse II Aktivierung hin ... 86
3.3 Mutagenese des Regulators ManR ... 88
3.3.1 Alanin-Mutagenese der potentiellen Phosphorylierungsstellen ... 88
3.3.2 ManR-Alanin-Mutanten zeigen unterschiedliche Bindeaktivitäten ... 89
3.3.3 Konstruktion von *B. subtilis* Stämmen mit chromosomaler P_{manP}-*lacZ*-Expressionskassette und mutierten *manR*-Allelen ... 90
3.3.4 Konstruktion von *manR*-Expressionsvektoren ... 93
3.3.5 Phosphomimikry durch Asp-Mutagenese ... 95
3.3.6 Deletion der $EIIB^{Bgl}$- und $EIIA^{Fru}$-Domänen von ManR ... 97
3.3.7 Inhibierung der ManR Aktivität durch EII^{Man} ... 98

3.4 Entwicklung eines selbstinduzierenden Expressionssystems für die Hochzelldichtefermentation ... 102
3.4.1 Die Deletion von *manA* führt zu einer Wachstumsinhibierung ... 102
3.4.2 Entwicklung einer Induktionsstrategie mit *B. subtilis* TQ356 ... 103
3.4.3 Fed-Batch-Fermentation mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 ... 105
3.5 Alternative Vektorsysteme ... 107
3.5.1 Das pBS72-Replicon als Stabilitätsfaktor ... 107
3.5.2 Chromosomale Integration von *repA* ermöglicht Kopienzahlerhöhung pBS72-basierten Vektoren ... 109
3.5.3 Alanin-Racemase Gen *alrA* als Selektionsmarker ... 111
3.6 Der Casamino Acids Effekt ... 116
3.6.1 Analyse der Medienzusammensetzung ... 116
3.6.2 Einfluss der Spurenelementlösung ... 117
3.6.3 Einfluss der Casamino Acids ... 119
3.6.4 Einfluss der Transkriptionsfaktoren CodY und TnrA ... 122
3.7 Hefeextrakt als günstige Induktoralternative? ... 126
3.7.1 Hefeextrakt zeigt nur schwach induzierende Wirkung ... 126
3.7.2 Inaktivierung der Mannanase GmuG ... 127
4 Diskussion ... 129
5 Literaturverzeichnis ... 143
6 Anhang ... 163
6.1 Annotierte Sequenz des *man* Operons von *B. subtilis* ... 163
6.2 Analysedaten verschiedener Casein-Hydrolysate ... 168
6.3 Plasmidkarten ... 169
7 Danksagung ... 173
8 Lebenslauf ... 175

Abkürzungsverzeichnis

Ap (*bla*) ..... Ampicillin (Resistenzgen)
AP..... Alkalische Phosphatase
APS ..... Ammoniumperoxodisulfat
ATP ..... Adenosintriphosphat
bp ..... Basenpaar(e)
BCAA(s) ..... *Branched-Chain Amino Acids*
Bgl ..... β-Glycoside
BSA ..... Bovines Serumalbumin
BT(-Medium) ..... Bactotrypton
CA(VF) ..... *Casamino Acids* (*Vitamin-Free*)
cAMP ..... *cyclic AMP* (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CCR..... *Carbon Catabolite Repression* (Katabolitrepression)
CEH..... *Caseine Enzymatic Hydrolysate*
Cm (*cat*) ..... Chloramphenicol (Resistenzgen)
cre(-Sequenz)..... *catabolite responsive element*
Crh ..... *Catabolite repression HPr*
Δ (Delta)..... Deletion
ddNTP(s)..... didesoxy-Nukleotidtriphosphat(e)
DNA..... *Deoxyribonucleic Acid*
dNTP(s) ..... desoxy-Nukleotidtriphosphat(e)
DMSO ..... Dimethylsulfoxid
EDTA ..... Ethylendiamintetraacetat
eGFP (*eGFP*)..... *enhanced Green Fluorescent Protein* (Gen)
EI ..... Enzym I
EII^x..... Enzym II (= PTS-Transporter von Substrat X)
Em (*ermC*)..... Erythromycin (Resistenzgen)
et al. ..... *et alii* (lat.: und andere)
FBP Fructose-1,6-bisphosphat
FP ..... *forward*-Primer
Fru ..... Fructose
Glc ..... Glucose
GOGAT ..... Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS ..... Glutamin-Synthase

GTP ..... Guanosintriphosphat
HABA 4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxylsäure
HTH ..... Helix-Turn-Helix (DNA-Bindemotiv)
HPr ..... Histidin-Protein
IPTG ..... Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb ..... Kilobasen (1.000 Basenpaare)
kDa ..... Kilodalton (1.000 Dalton)
Km (*neo*) ..... Kanamycin (Resistenzgen)
KMVL ..... Kao & Michayluk Vitamin-Lösung
LB_x(-Medium) ..... *Lysogeny Broth* (Medium) mit Antibiotikum X
µ ..... spezifische Wachstumsrate
Man ..... Mannose
Mtl ..... Mannitol
Ni-NTA ..... Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD_x ..... optische Dichte bei x nm
o-NPG ..... o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
ORF ..... *Open Reading Frame*
ori ..... *origin of replication* (Replikationsursprung)
~P ..... Phosphorylgruppe (energiereich)
P_x ..... Promotor von Gen *x*
PCR ..... *Polymerase Chain Reaction*
PEG ..... Polyethylenglycol
PEP ..... Phosphoenolpyruvat
PFAM ..... *Protein Families* (bioinformatische Datenbank)
pH ..... negativer, dekadischer Logarithmus der H^+-Konzentration
pI ..... pH-Wert am isoelektrischen Punkt (Nettoladung = 0)
PLP ..... Pyridoxal-5′-phosphat
PRD ..... PTS-Regulationsdomäne
PTS ..... Phosphoenolpyruvat:Phosphotransferasesystem
RAT(-Sequenz) ..... *ribonucleic antiterminator*
RFE ..... relative Fluoreszenzeinheiten
RNA ..... *Ribonucleic Acid*
- mRNA ..... *messenger*-RNA
- tRNA ..... *transfer*-RNA
- rRNA ..... ribosomale RNA

RP ..... *reverse*-Primer

rpm ..... *rotations per minute*
RT ..... Raumtemperatur (ca. 20 °C)
SDS-PAGE ..... *Sodium Dodecyl Sulfate*- Polyacrylamidgelelektrophorese
SEL ..... Spurenelementlösung
SMM ..... *Spizizen's Minimal Salts Medium*
Sp (*aad9*) ..... Spectinomycin (Resistenzgen)
TAE ..... TRIS/Acetat/EDTA
TBE ..... TRIS/Borsäure/EDTA
Tc (*tet*) ..... Tetracyclin (Resistenzgen)
TE ..... TRIS/EDTA
TEMED ..... *N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin
ter ..... Transkriptionsterminator
TRIS ..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ts ..... temperatursensitiv
TSS ..... *Transformation and Storage Solution*
TY ..... Trypton / *Yeast* (= Hefeextrakt)
U ..... *Units* (Einheit für Enzymaktivität)
ÜK ..... Übernachtkultur
UTR ..... untranslatierte Region (der mRNA)
VE ..... vollständig entionisiert
VK(-Medium) ..... Vorkultur(-medium)
v/v ..... *volume per volume*
w/v ..... *weight per volume*
X ..... Symbol für die Biomasse
X-Gal 5-Brom-4-Chlor-indolyl-β-D-galactopyranosid
$Y_{P/X}$ ..... Ausbeutekoeffizient von Produkt (P) zu Biomasse (X)

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Transkriptionsaktivator ManR des *Bacillus subtilis* Operons für den Mannose-Metabolismus näher charakterisiert. Er besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne, zwei Phosphotransferasesystem (PTS)-Regulationsdomänen (PRDs) sowie einer EII^{Bgl}- und einer $EIIA^{Fru}$-ähnlichen Domäne. In Analogie zu anderen PRD-haltigen Regulatoren war eine Steuerung der Aktivität von ManR durch Phosphorylierung wahrscheinlich. Die ortsgerichtete Mutagenese von ManR wurde verwendet, um die Rolle seiner konservierten Aminosäure-Reste als potentielle Phosphorylierungsstellen zu untersuchen. Die Aktivität der ManR-Mutanten wurde *in vivo* über β-Galaktosidase-Aktivitätstests sowie *in vitro* über Gelmobilityshift Assays nachgewiesen. Für die *in vitro* Versuche mussten die isolierten ManR-Moleküle zuvor mit den PTS-Komponenten HPr, EI und PEP aktiviert werden. Mutationen in der PRD1 reduzierten die Aktivität von ManR, während Mutationen in der PRD2 diese vollständig aufhoben. Die Cys415Ala-($EIIB^{Bgl}$) und die His570Ala-Mutationen ($EIIA^{Fru}$) riefen konstitutive Aktivitäten unterschiedlichen Ausmaßes hervor, wobei letztere den größeren Einfluss hatte. Im Wildtyp und in der Cys415Ala-Mutante verringerte die Anwesenheit der PTS-Transporterdomänen $EIIBA^{Man}$ die DNA-Bindeaktivität von ManR signifikant. Dies war jedoch nicht bei der His570Ala-Mutante der Fall. Durch den Austausch der konservierten Aminosäuren von ManR gegen Aspartat konnte keine Phosphomimikry beobachtet werden. Die unterschiedlichen Expressionsniveaus ausgehend von den ManR-kontrollierten Promotoren von *manR* (P_{manR}) und des *manPA-yjdF* Operons (P_{manP}) konnten der unterschiedlichen 5′-untranslatierten Region der mRNAs zugeordnet werden. Über DNase I Footprinting Experimente wurden palindromähnliche Sequenzen mit einer Länge von 44 bp als ManR-Bindestellen identifiziert. Des Weiteren wurden die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und die Dissoziationsraten k_{diss} von ManR bezüglich beider Promotorregionen bestimmt.

Das Mannose-induzierbare Expressionssystem zur Produktion heterologer Proteine in *B. subtilis* führt zu relativ hohen Produktausbeuten, benötigt dafür jedoch hohe Mengen des teuren Induktors Mannose. Die Deletion des Gens für die Mannose-6-

phosphat-Isomerase *manA* reduziert zwar den Induktorverbrauch, führt jedoch zur Sensitivität der Zellen gegenüber Mannose. Preisgünstiger, Mannose-haltiger Hefeextrakt wurde als Induktoralternative getestet, zeigte jedoch nur eine geringe Induktionswirkung. Um die Produktausbeute bei gleichzeitiger Reduzierung der Induktorkosten zu steigern, wurde deshalb ein neuartiges, selbstinduzierendes Expressionssystem mit dem PTS-Transporter negativen Stamm *B. subtilis* TQ356 (*spo0A3* Δ*manP::ermC*) entwickelt, bei dem Glucose die Induktion durch Katabolitrepression verhindert. Für optimale selbstinduzierende Bedingungen wurde eine Glucose-limitierende Prozessstrategie, nämlich ein Fed-Batch-Prozess, herangezogen: Die Selbstinduktion startet mit dem Beginn des Übergangs von der Batch- in die Zufütterungsphase, an dem Glucose limitierend wird, und bleibt während der gesamten Glucose-limitierten Zufütterungsphase erhalten. Dies führt im Vergleich zum Standardsystem zu einer Steigerung der Produktausbeute um fast das 3-fache.

Der für das neue System verwendete, pUB110-basierte *eGFP*-Expressionsvektor (pMW168.1), der nach dem Rolling-Circle-Mechanismus repliziert, zeigte Instabilität bei der Segregation. Die Verwendung eines Replicons, welches nach dem Theta-Mechanismus repliziert, stabilisierte die Weitergabe an die Tochterzellen. Da mit diesem Replicon allerdings auch eine Reduzierung der Plasmidkopienzahl einherging, reduzierte sich entsprechend auch die Ausbeute und Produktivität des selbstinduzierenden Systems mit diesem Vektor. Selbst durch eine Erhöhung der Kopienzahl desselben Vektors wurden nicht die Werte erreicht, die mit pMW168.1 erzielt wurden. Die Anwendung der Alanin-Racemase als metabolischen Selektionsmarker funktionierte zwar in Schüttelkolbenexperimenten, jedoch nicht bei der Anwendung in der Hochzelldichtefermentation.

Die verwendeten Medien zeigten einen starken Einfluss auf die Expression von *eGFP* mit diesem System: Die Spurenelemente führten zu einem beschleunigten Wachstum, wodurch die Zellen länger in Glucose-Limitation waren und dementsprechend mehr eGFP produzieren konnten. Der beobachtete negative Effekt der Casamino Acids auf die *eGFP* Expression wurde eingehend untersucht, führte jedoch zu keinem eindeutigen Resultat in Bezug auf eine bestimmte Komponente oder bestimmten Regulator.

Summary

In this study, the transcriptional activator ManR of the *Bacillus subtilis* mannose utilization operon was characterized. This protein is composed of an N-terminal DNA-binding domain, two phosphotransferase system (PTS) regulation domains (PRDs), an $EIIB^{Bgl}$- and an $EIIA^{Fru}$-like domain. In analogy to other PRD-containing regulators, stimulation of ManR activity by phosphorylation is proposed. Site-specific mutagenesis of ManR was used to reveal the role of its conserved amino acids as potential phosphorylation sites. This was investigated *in vivo* by β-galactosidase activity tests and *in vitro* by mobility shift assays. For the *in vitro* experiments, ManR had to be first activated by the PTS components HPr, EI and PEP. Mutations in PRD1 lowered ManR activity, whereas mutations in PRD2 abolished it completely. The Cys415Ala ($EIIB^{Bgl}$) and the His570Ala mutations ($EIIA^{Fru}$) provoked constitutive activities to different degrees, whereas the latter had the greater influence. Addition of the PTS-transporter domains $EIIBA^{Man}$ reduced the binding capability significantly in a wild type and a Cys415Ala background, but had no effect on a His570Ala mutant. The conserved amino acids of ManR were also exchanged to aspartic acid. However, the intended phosphomimicry did not work with ManR. The different expression levels originating from the ManR-controlled promoters of *manR* (P_{manR}) and the *manPA-yjdF* operon (P_{manP}) could be ascribed to different 5´-un-translated mRNA regions. Sequences of 44 bps with a palindromic character were identified and confirmed as the ManR binding sites by DNase I footprinting. The binding properties of ManR, in particular the equilibrium dissociation constant K_D and the dissociation rate k_{diss}, were determined for both promoter regions.

The standard mannose-inducible expression system for heterologous protein production in *Bacillus subtilis* involves P_{manP}. It led to relatively high product yields but required large quantities of mannose to induce the reactions, thus rendering the system's technical application with respect to the inducer costs too expensive. To reduce the amount of inducer, *B. subtilis manA* mutant strains were constructed, which, however, displayed sensitivity to mannose. Mannose containing yeast extract as a cheap inducer alternative was testet, but showed, however, only weak induction

capabilities. With the aim of increasing product yields at the same time as decreasing production costs, a novel technically compliant and inducer-independent self-induction system with the PTS-transporter negative strain TQ356 (*spo0A3* Δ*manP::ermC*) was developed, in which glucose prevents induction by carbon catabolite repression. To create optimal self-induction conditions, a glucose limited process strategy, namely a fed-batch process, was utilized: The initiation of self-induction at the beginning of the glucose-restricted transition phase between the batch- and feeding-phase of fermentation, and its maintenance throughout the entire glucose-limiting feeding-phase led to a nearly 3-fold increase of product yield compared to the standard system.

The used pUB110-derived *eGFP*-expression vector (pMW168.1), which replicates after the rolling-circle mechanism, suffered from segregational instabilities. Exchange of the replicon to a more stable theta-replicating replicon raised its stability. Due to the accompanied reduction of the copy number, yield and productivity decreased with this system. Raising the copy number with respect to maintain the stability did not reach the levels gained with pMW168.1. Application of the alanine racemase as a metabolic selectable marker worked out well in shaking flask experiments, but failed in the application in a stirred-tank reactor.

A strong influence of the used media on *eGFP* expression could be observed: Usage of the trace element solution raised the specific growth rate μ granting the cells more time in glucose limitation, which induced *eGFP* expression. The observed negative effect of the Casamino Acids on *eGFP* expression was studied, but could not be attributed to a certain component or regulator protein.

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist *Bacillus subtilis* zu einem Modellorganismus für Gram-positive Bakterien avanciert. Die Erforschung der Sporulation an diesem Organismus lieferte Wissenschaftlern zahlreiche Erkenntnisse über die Vorgänge bei dieser einfachen Form der Zelldifferenzierung (Piggot und Hilbert, 2004). Seine zahlreichen positiven Eigenschaften sowie Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Daten haben ihn außerdem immer mehr in den Blickpunkt biotechnologischer Forschung und Anwendung rücken lassen.

1.1 *Bacillus subtilis*

1.1.1 Systematik, Morphologie und Physiologie

Bacillus subtilis (lat. *bacillus* - Stäbchen; *subtilis* - einfach, schlicht) wurde erstmals im Jahre 1835 durch C. G. Ehrenberg unter dem Namen *Vibrio subtilis* (lat. *vibrare* - sich schnell hin- und herbewegend, vibrierend) beschrieben (Ehrenberg, 1835). Erst 37 Jahre später wurde er durch F. J. Cohn schließlich in *Bacillus subtilis* umbenannt (Cohn, 1872). Systematisch zählt dieses Gram-positive, nicht-pathogene Bakterium zum Reich der Bacteria, und darin zur Abteilung der Firmicutes. Dort wird *B. subtilis* zur Klasse der Bacilli mit niedrigem GC-Gehalt zugeordnet (Tabelle 1–1). Zur Gattung *Bacillus* zählen derzeit 279 bekannte Arten [LPSN-Datenbank[1]; (Euzéby, 1997)]. Darunter existieren auch human-pathogene Vertreter wie der Milzbrand-Erreger *B. anthracis* und *B. cereus,* der eine Lebensmittelvergiftung verursacht. Ein Insekten-pathogener Vertreter dieser Gruppe ist *B. thuringiensis*, dessen Bt-Toxine zur biologischen Schädlingsbekämpfung in der Land- und Forstwirtschaft eingesetzt werden.

Im vegetativen Zustand besitzt *B. subtilis* eine durchschnittlich 2,5 µm lange und 0,5 µm breite Stäbchenform (Abbildung 1–1) und ist peritrich, d.h. rund um die gesamte Zelle begeißelt. Sein natürlicher Lebensraum ist die oberste Bodenschicht einschließlich der Rhizosphäre. Dort ist er durch sein ausgeprägtes Repertoire an

[1] http://www.bacterio.net/bacillus.html

extrazellulären Enzymen, wie Proteasen und Glucanasen (z.B. die α-Amylase), an zahlreichen Zersetzungsvorgängen beteiligt und trägt zur Rückführung organischer Stoffe in den Nahrungskreislauf bei. Die gewonnenen Substrate werden von *B. subtilis* passiv über erleichterte Diffusion bzw. aktiv über ABC-Transporter oder das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS) aufgenommen.

Tabelle 1-1: Systematik von *B. subtilis*.

Reich:	Bacteria
Abteilung:	Firmicutes
Klasse:	Bacilli
Ordnung:	Bacillales
Familie:	Bacillaceae
Gattung:	*Bacillus*
Art:	*Bacillus subtilis*

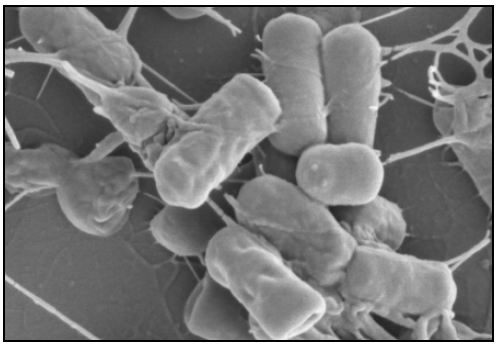


Abbildung 1-1: Aufnahme von *B. subtilis* 168 mit dem Rasterelektronenmikroskop (verändert nach Zweers *et al.*, 2008).

B. subtilis ist mesophil, fakultativ aerob und ernährt sich chemoorganoheterotroph, d.h. er nutzt organische Verbindungen als Kohlenstoffquelle und zur Energiegewinnung. Bei Sauerstofflimitation und Anwesenheit von Nitrat als Elektronenakzeptor kann *B. subtilis* einen Gärungsstoffwechsel in Gang setzen, bei dem Lactat, Ethanol, Acetoin und 2,3-Butandiol erzeugt werden (Nakano *et al.*, 1997). Der Zucker D-Glucose stellt die bevorzugte Kohlenstoffquelle dar. Ist D-Glucose vorhanden, wird die Expression von Genen für die Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen reprimiert. Dieser regulatorische Vorgang wird als Katabolitrepression bezeichnet.

Kommt es zu einer länger andauernden Nährstoff- oder Sauerstofflimitation führt das Spo0-Phosphorelay-System zur irreversiblen Bildung thermoresistenter Endosporen (Hoch, 1993). Die Sporulation und Sporenkeimung wurde bei *B. subtilis* mittlerweile so gut untersucht, dass er zu einem Modellorganimus für die einfache Zelldifferenzierung geworden ist.

1.1.2 Genetische Eigenschaften

Auch in der Genetik ist *B. subtilis* zu einem Modellorganismus für Gram-positive Bakterien avanciert. Ausschlaggebend dafür war die Entdeckung der „Kompetenz" (Anagnostopoulos und Spizizen, 1961; Chen und Dubnau, 2004; Spizizen, 1958): Unter bestimmten physiologischen Bedingungen ist *B. subtilis* in der Lage, DNA aus dem umgebenden Medium aufnehmen. Eine solche Kultur enthält allerdings nur maximal 20% kompetente Zellen (Schumann, 2007). Die Eigenschaft der Kompetenzentwicklung macht man sich bei der natürlichen Transformation von *B. subtilis* zunutze (Chen und Dubnau, 2004): Nach Bindung der extrazellulären Fremd-DNA an den membranständigen DNA-Rezeptor ComEA, kommt es zu einer unspezifischen Linearisierung der DNA durch ebenfalls membranständige Endonukleasen (z.B. NucA). Die aktive Aufnahme der DNA in die Zelle, bei der einer der beiden Stränge abgebaut wird, erfolgt über das ComEC-Kanalprotein. Dabei wird ATP durch den ComFA-Komplex verbraucht, der ebenfalls an der Aufnahme beteiligt ist. Die eintretende, einzelsträngige DNA wird durch cytoplasmatische Proteine vor dem sofortigen Abbau geschützt. Sind homologe Regionen auf der aufgenommenen DNA vorhanden, können Rekombinationen über einen RecA-abhängigen Mechanismus mit dem Chromosom stattfinden. Handelt es sich um Plasmid-DNA kann sich diese auch extrachromosomal etablieren.

Alternative Methoden, *B. subtilis* mit exogener DNA zu transformieren, sind die Elektroporation und die Protoplastierung. Mithilfe all dieser Techniken konnte bereits schon vor der Sequenzierung des kompletten Genoms eine Genkarte für *B. subtilis* erstellt werden. Die vollständige Sequenz des Genoms von *B. subtilis* 168, der 1947 aus dem *B. subtilis* Marburg Stamm isoliert wurde (Burkholder und Giles, 1947), wurde 1997 von einem internationalen Konsortium von Wissenschaftlern zusammengesetzt und veröffentlicht (Kunst *et al.*, 1997). Je nach Arbeitsgruppe unterschieden sich jedoch die verwendeten Methoden zur Sequenzierung. Durch die Entwicklung besserer Sequenziermethoden konnte das Genom 12 Jahre später erneut komplett resequenziert werden (Barbe *et al.*, 2009). Das zirkuläre Genom von *B. subtilis* 168 umfasst mit einer Gesamtlänge von 4.215.606 bp (GenBank: AL009126) und einem GC-Gehalt von 43,5% insgesamt 4.244 Gene für Proteine, 86 tRNA Gene,

30 rRNA Gene und 62 weitere RNA Gene. Diese wurden u.a. in der Referenzdatenbank GenoList (ehemals SubtiList)[2] hinterlegt (Moszer *et al.*, 2002). Mittlerweile wurden elf weitere *B. subtilis* Stämme vollständig sequenziert. Darunter ist mit *B. subtilis* BEST7613 auch ein Stamm mit einem chimären Genom, bei dem das komplette Genom des Cyanobacteriums *Synechocystis* PCC6803 unter Anwendung einer neuen Klonierungstechnik (*Mega-Cloning*) mit dem Genom von *B. subtilis* 168 vereint wurde (Itaya *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2012).

1.1.3 Biotechnologische Bedeutung

B. subtilis besitzt GRAS-Status (*Generally Recognized As Safe*), ist genetisch einfach zu manipulieren, weist keine ausgeprägte artspezifische *Codon usage* auf und besitzt ein vollständig sequenziertes und gut annotiertes Genom. Mit dem Sec- und Tat-System stehen ihm außerdem zwei leistungsfähige Wege zur Sekretion von Proteinen zur Verfügung (Simonen und Palva, 1993; van Dijl *et al.*, 2002). Darüber hinaus existieren mittlerweile viele Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Daten.

ROTE BIOTECHNOLOGIE. Unter den Handelsnamen UTILIN® und BACTISUBTIL® kommt *B. subtilis* als lyophilisiertes Präparat bei Darmerkrankungen zum Einsatz (Quelle: Arzneimittelverzeichnis Rote Liste®, 1997). Hyaluronsäure wird mittlerweile von der Fa. Novozymes mithilfe gentechnisch veränderter *B. subtilis* Zellen produziert, die das *hasA* Gen (Hyaluronan-Synthase) aus dem früheren Hyaluronsäure-Produzenten *Streptococcus equisimilis* tragen (Widner *et al.*, 2005). Neben *B. licheniformis* dient *B. subtilis* als Produzent des Polypeptid-Antibiotikums Bacitracin, das in die Murein-Biosynthese eingreift und damit hauptsächlich gegen Gram-positive Krankheitserreger eingesetzt wird. In dem japanischen Sojaprodukt Nattō ist die Subspecies *B. subtilis natto* enthalten. Aus diesem Stamm konnte die Subtilisin-ähnliche Nattokinase (EC 3.4.21.62) isoliert werden, die in der Alternativen Medizin zur Behandlung der Alzheimer Krankheit sowie als Blutverdünner und Thrombolytikum eingesetzt wird (Hsu *et al.*, 2009; Sumi *et al.*, 1990).

[2] http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList.woa/wa/goToTaxoRank?level=Bacillus%20subtilis%20168

GRÜNE BIOTECHNOLOGIE. Die *B. subtilis* Stämme QST713 und B246, die unter den Handelnamen SERENADE® (http://www.agraquest.com) bzw. AVOGREEN® (http://www.avocadosource.com) kommerziell erhältlich sind, finden als natürliche Biofungizide landwirtschaftliche Verwendung. Darüberhinaus hat die Fa. Monsanto ein Gen aus *B. subtlis*, welches für das Kälteschockprotein CSPB codiert, in ihre dürreresistente Getreidesorte MON 87490 gebracht, um diese gegen Kälteperioden abzuhärten (Harrigan *et al.*, 2009).

WEIßE BIOTECHNOLOGIE. Die „Zellfabrik" *B. subtilis* hat sich v.a. als Produzent für das Waschmittelenzym Subtilisin E, einer äußerst wirksamen Serin-Protease, einen Namen gemacht. Des Weiteren hat die Fa. Novozymes Enzyme aus *B. subtilis* unter den Handelsnamen *Maturex* und *Novamyl* auf den Markt gebracht. Das Brauenzym *Maturex* (α-Acetolactat-Decarboxylase) führt zu kürzeren Reifungszeiten von Bier, indem es die unerwünschte Bildung von Diacetyl im Gärungsprozess verhindert[3]. Die maltogene α-Amylase *Novamyl* wird von Bäckereien eingesetzt, um die Retrogradation[4] von Stärke zu reduzieren. Dadurch kann Teig länger frisch bleiben. Das Unternehmen Roche Vitamins AG (heute DSM) hat mithilfe gentechnisch veränderter *B. subtilis* Stämme ein effizientes Verfahren für die biotechnologische Produktion von Riboflavin (Vitamin B_2) entwickelt und damit das konventionelle, chemische Syntheseverfahren zumindest gleichwertig ersetzt (Stahmann *et al.*, 2000).

Stammoptimierungen sollten *B. subtilis* als gleichwertige Alternative zu *Escherichia coli* für die heterologe Proteinexpression etablieren (Westers *et al.*, 2004). So konnten mit *B. subtilis* u.a. die humanen Proteine Proinsulin, Interferon-α2, Wachstumshormon und tPA (*tissue*-Plasminogenaktivator) produziert werden (Honjo *et al.*, 1987; Olmos-Soto und Contreras-Flores, 2003; Schein *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1989). Den großen Durchbruch wie *E. coli* hat *B. subtilis* hierbei jedoch noch nicht erreicht. Neben zahlreichen extrazellulären Proteasen, die die Ausbeute senken, ist die Produktion und Sekretion heterologer Proteine bisher zu ineffektiv. Häufig kommt es zur intrazellulären Degradation sowie zur Bildung intrazellulärer Agglomerate (*Inclusion*

[3] Anmerkung: Aufgrund des Reinheitsgebots für Bier von 1516 keine Anwendung in Deutschland.

[4] Amylose in der Stärke gibt Flüssigkeit ab und wird kristallin → Ursache für das „Altbackenwerden"

bodies). Des Weiteren zeigen die vorhandenen Expressionsvektoren oft nur eine geringe Stabilität, und die Expressionssysteme selbst sind oft nicht ausreichend gut reguliert. Um diesen Problemen beizukommen, wurden bereits Protease- und sporulations-defiziente Stämme entwickelt (Michel und Millet, 1970; Wu *et al.*, 1991). Ferner wurden verschiedene Replicons getestet, um die Stabilität der Vektoren zu verbessern (Janniere *et al.*, 1990; Titok *et al.*, 2003).

1.2 Regulation des Kohlenstoffmetabolismus

B. subtilis ist in der Lage, zahlreiche Mono- und Disaccharide als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Die Expression der vielen katabolischen Operons kann allerdings nur induziert werden, wenn die bevorzugte Kohlenstoffquelle D-Glucose nicht zur Verfügung steht. Den regulatorischen Vorgang dahinter bezeichnet man als „Katabolitrepression" (engl. *Carbon Catabolite Repression*, kurz CCR). Die zentralen Rollen übernehmen dabei das Histidin-Protein (HPr) aus dem Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferasesystem (PTS), die bifunktionelle HPr-Kinase/ Phosphatase (HPrK/P), der globale Transkriptionsregulator CcpA (*Catabolite control protein A*), das zu HPr homologe Crh (*Catabolite repression HPr*), sowie Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) und ATP (Deutscher *et al.*, 2006; Galinier *et al.*, 1997; Stülke und Hillen, 2000).

1.2.1 Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem

Das Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS) von *B. subtilis* besteht aus den löslichen Proteinen EI (Enzym I) und HPr (Histidin-Protein) sowie einer membrangebundenen, Zucker-spezifischen Permease EII (Enzym II). Letztere besteht meist aus den cytoplasmatisch lokalisierten und für die Phosphorylierung zuständigen Untereinheiten EIIA und EIIB sowie der membrangebunden Domäne EIIC, die den Transportkanal ausbildet. In *B. subtilis* werden viele Zucker, Zuckeralkohole und auch Glucosamine durch ein PTS aufgenommen und dabei gleichzeitig phosphoryliert (Abbildung 1–1). Die Phosphorylgruppenübertragung erfolgt über PEP, EI, HPr und EIIA auf EIIB,

welches die Phosphorylgruppe schließlich auf das über EIIC eingeschleuste PTS-Substrat überträgt. Die phosphorylierten Substrate werden anschließend über die Glykolyse weiter verstoffwechselt, wobei PEP entsteht, das nun wieder als Phosphorylgruppen-Donor fungieren kann.

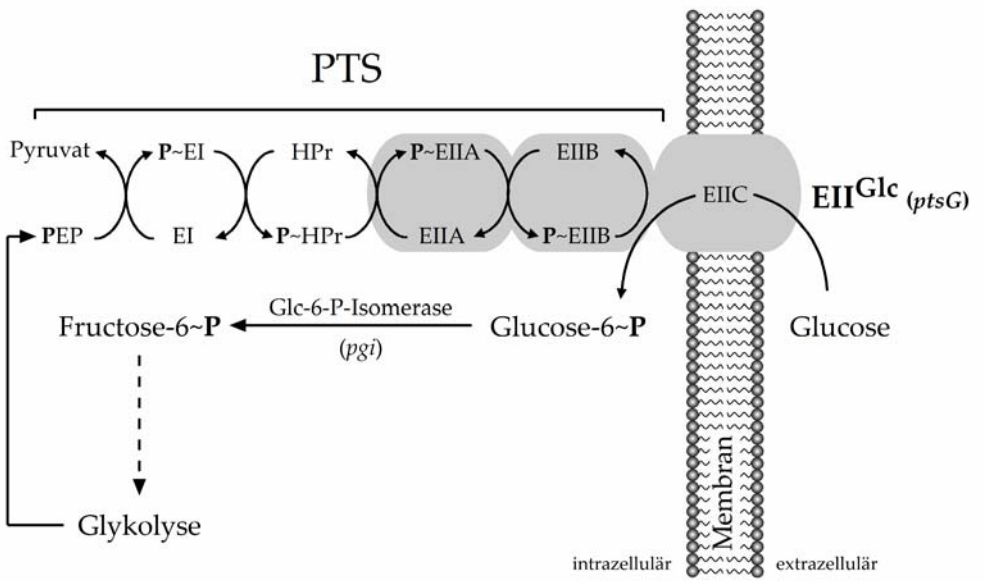


Abbildung 1-2: PTS-vermittelte Aufnahme von D-Glucose in *B. subtilis*. D-Glucose wird über EII^{Glc} aufgenommen, dabei zu Glucose-6~P phosphoryliert und weiter zu Fructose-6~P isomerisiert. Beim weiteren glykolytischen Abau wird PEP generiert, das dadurch wieder als Phosphorylgruppen-Donor im PTS dienen kann.

D-Glucose (Glc) ist die bevorzugte Kohlenstoff- und Energiequelle von *B. subtilis* und wird primär über den PTS-Transporter EII^{Glc}, der durch *ptsG* codiert wird, aufgenommen (Gonzy-Tréboul *et al.*, 1991). Bei der Aufnahme wird Glc zu Glc-6~P phosphoryliert. Das Glucose-Operon besteht neben *ptsG* aus *ptsH* (HPr) und *ptsI* (EI) und wird durch den Antiterminator GlcT reguliert, dessen Gen unmittelbar stromaufwärts des *ptsG-ptsHI* Operons liegt (Bachem und Stülke, 1998; Schilling *et al.*, 2004). Damit EI und HPr auch bei Abwesenheit von Glucose für andere PTS-Zucker zur Verfügung stehen, werden diese beiden Gene zusätzlich über einen eigenen Promotor transkribiert.

1.2.2 HPr, Crh und die HPr-Kinase/Phosphatase

Eine zentrale Rolle bei der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels übernimmt HPr, welches mit His-15 und Ser-46 zwei Phosphorylierungsstellen besitzt und damit vier mögliche Phosphorylierungszustände einnehmen kann, um seiner Rolle gerecht zu werden (Deutscher und Saier, Jr., 1983). Daneben existiert mit Crh ein weiteres, funktionell homologes Protein zu HPr in *B. subtilis*, welches allerdings nur die Ser-46 Phosphorylierungsstelle aufweist (Galinier *et al.*, 1997). HPr wird am His-15 durch EI phosphoryliert. HPr-His-15~P wiederum überträgt seine Phosphorylgruppe an die Transporter-Untereinheit EIIA und/oder an PTS-Regulationsdomänen (PRDs) von Regulatoren. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung am Ser-46 von HPr bzw. Crh dient als regulatorisches Signal und erfolgt durch die bifunktionelle HPr-Kinase/Phosphatase (HPrK/P), die durch das Gen *hprK* (früher *ptsK*) codiert wird (Galinier *et al.*, 1998; Reizer *et al.*, 1998). Die HPrK/P wird durch kooperative Bindung von ATP und FBP aktiviert und reagiert damit auf die Verfügbarkeit von primären Kohlenstoffquellen, wie Glucose und Fructose (Jault *et al.*, 2000). Hohe intrazelluläre Konzentrationen von anorganischem Phosphat inhibieren die Kinase-Aktivität und stimulieren die Phosphatase-Aktivität (Galinier *et al.*, 1998; Reizer *et al.*, 1998). Die ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr am Ser-46 durch die HPrK/P inhibiert außerdem die Phosphorylierungsrate am His-15 durch EI um das 600-fache (Deutscher *et al.*, 1984). Die Deletion von *hprK* führt zur Aufhebung der CCR in *B. subtilis* und hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum; eine HPrK/P mit partieller Kinase- und keiner Phosphatase-Aktivität lässt wiederum eine CCR zu, führt jedoch zu wesentlich schlechterem Wachstum, das auf eine permanente Repression durch HPr-Ser-46~P und CcpA zurückzuführen ist (Hanson *et al.*, 2002).

1.2.3 Der globale Regulator CcpA

CcpA (*Catabolite control protein A*) ist der globale Transkriptionsregulator des Kohlenstoffmetabolismus in *B. subtilis* und anderen Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (Chauvaux, 1996; Fujita, 2009; Warner und Lolkema, 2003). Er ist ein Mitglied der LacI/GalR-Proteinfamilie (Weickert und Adhya, 1992) und kann sowohl reprimierend als auch aktivierend wirken (Stülke und Hillen, 2000). Die

Aktivierung von CcpA erfolgt durch Dimerbildung nach Interaktion mit den Cofaktoren HPr-Ser-46~P bzw. Crh-Ser-46~P (Deutscher *et al.*, 1994; Deutscher *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1995; Galinier *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). Dieser Komplex bindet an Operatoren mit der Konsensussequenz 5'-TGWAARCGYTWNCW-3' [mit N = beliebige Base, W = A/T, R = A/G, Y = C/T], die man als *cre*-Sequenz (engl. *catabolite responsive element*) bezeichnet (Jones *et al.*, 1997; Stülke und Hillen, 2000). Die Lage dieser Sequenz relativ zum Transkriptionsstart bestimmt den regulatorischen Einfluss von CcpA: Liegt die *cre*-Sequenz stromaufwärts der -35-Promotorregion, wie z.B. bei *ackA* und *pta*, kommt es zu einer Aktivierung der Transkription (Presecan-Siedel *et al.*, 1999; Turinsky *et al.*, 1998). Liegt die *cre*-Sequenz stromabwärts oder überlappt mit dem Transkriptionsstart, wie z.B. bei *manR*, kommt es entweder zu einer Blockade der RNA-Polymerase bei der Elongation oder die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor wird komplett verhindert (Lulko *et al.*, 2007; Sun und Altenbuchner, 2010).

1.2.4 PRD-haltige Transkriptionsregulatoren

Neben Regulatoren wie GutR, die durch Bindung des Induktors (hier: D-Glucitol) allosterisch aktiviert werden (Poon *et al.*, 2001), und Zweikomponenten-Systemen, mit denen *B. subtilis* auf äußere Stimuli reagieren kann (Fabret *et al.*, 1999), gibt es eine Klasse von Regulatoren, die durch Phosphorylierung auf die An- oder Abwesenheit von Induktoren reagiert, und die in drei Gruppen unterteilt wird:

1) Regulatoren wie z.B. HprR aus *Clostridium acetobutylicum* (Reizer *et al.*, 1999), die EIIA- und/oder HPr-Domänen besitzen, welche direkt von HPr-His-15~P phosphoryliert werden.
2) Glycerin-Kinasen, die von HPr-His-15~P an einem konservierten Histidin-Rest phosphoryliert werden und so den Glycerin-Stoffwechsel steuern (Deutscher *et al.*, 2006).
3) Regulatoren mit sogenannten PRDs (PTS-Regulationsdomänen), die von HPr-His-15~P und/oder EII~P phosphoryliert werden (Deutscher *et al.*, 2006; Greenberg *et al.*, 2002; Stülke *et al.*, 1998).

Die letzte Gruppe wird nochmals in Antiterminatoren und Aktivatoren unterteilt. In den PRDs findet man ein bis zwei gut konservierte Histidin-Reste, die als potentielle Phosphorylierungsstellen dienen (Deutscher *et al.*, 2006). Die meisten Proteine dieser Klasse besitzen zwei PRDs, die man als PRD1 und PRD2 bezeichnet und unterschiedliche regulatorische Funktionen ausüben können.

ANTITERMINATOREN. Zur Klasse der PRD-haltigen Antiterminatoren in *B. subtilis* gehören die vier Mitglieder der BglG/SacY-Proteinfamilie LicT, SacT, SacY und GlcT (Bachem und Stülke, 1998; Débarbouillé *et al.*, 1990; Idelson und Amster-Choder, 1998; Schnetz *et al.*, 1996). Sie besitzen alle den gleichen modularen Aufbau: eine N-terminale RNA-Bindedomäne, gefolgt von PRD1 und PRD2 (Greenberg *et al.*, 2002). Sie binden an sogenannte RAT-Sequenzen (Abk. für engl. *ribonucleic antiterminator*) in der *leader*-Region der mRNA (Aymerich und Steinmetz, 1992) und verhindern so die Ausbildung einer ρ-unabhängigen Terminatorstruktur am 5′-Ende der mRNA (= Antitermination). Wenn die jeweiligen Induktoren nicht vorhanden sind, werden alle vier Mitglieder durch Phosphorylierung der PRD1 über ihren jeweiligen PTS-Transporter negativ reguliert (Deutscher *et al.*, 2006; Tortosa *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu SacY und GlcT benötigen SacT und LicT eine zusätzliche Phosphorylierung der PRD2 durch HPr-His-15~P, um aktiv zu werden (Arnaud *et al.*, 1996; Lindner *et al.*, 1999). Während sie im aktiven Zustand als Homodimer an die RAT-Sequenzen binden (Declerck *et al.*, 2001; Graille *et al.*, 2005), ist unklar, ob sie im inaktiven Zustand als Monomer und/oder an den jeweiligen PTS-Transporter gebunden vorliegen.

AKTIVATOREN. Bislang sind vier PRD-haltige Aktivatoren in *B. subtilis* charakterisiert worden: LevR, LicR, MtlR und ManR (Débarbouillé *et al.*, 1991; Joyet *et al.*, 2010; Sun und Altenbuchner, 2010; Tobisch *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den Antiterminatoren besitzen sie außerdem EIIB- und/oder EIIA-ähnliche Domänen mit jeweils einer konservierten, potentiellen Phosphorylierungsstelle. Der modulare Aufbau ist insgesamt variabler als bei den Antiterminatoren (Greenberg *et al.*, 2002). Damit können die Aktivatoren bis zu sechs Phosphorylierungsstellen besitzen: je zwei in den PRDs und je eine in der EIIB- und der EIIA-ähnlichen Domäne. Auch hier entscheidet der Phosphorylierungszustand der einzelnen Domänen über die

Regulatoraktivität. Die EIIB- und EIIA-ähnlichen Domänen der Aktivatoren besitzen meist ebenfalls eine regulatorische Funktion. Im Gegensatz zu den Antiterminatoren ist der regulatorische Einfluss der Phosphorylierung von PRD1 und PRD2 weniger klar verteilt (Deutscher *et al.*, 2006). So konnte für die Aktivierung des Mannitol-Regulators MtlR gezeigt werden (s. Kapitel 1.2.5, Abbildung 1–3), dass die PRD2 phosphoryliert und die EIIB- und EIIA-ähnlichen Domänen dephosphoryliert sein müssen, während die PRD1 scheinbar keine regulatorische Funktion besitzt (Joyet *et al.*, 2010). Ebenso scheint $EIIB^{Mtl}$ essentiell für die Aktivierung von MtlR zu sein, da die Deletion dieser Domäne in einer *mtlA* (EIIA) Mutante die konstitutive Expression des *mtlAFD* Operons verhindert (Bouraoui *et al.*, 2013). Als mögliche Erklärung postulierten die Autoren eine erforderliche Bindung von MtlR an die Membran über $EIIB^{Mtl}$, um MtlR in einen aktiven Zustand zu versetzen. Dagegen ist ManR nicht von $EIIB^{Man}$ abhängig, da eine *manP* Mutante (EII^{Man}) volle konstitutive Expression zeigt (Sun und Altenbuchner, 2010). Dieser negative Regulationseffekt des PTS-Transporters auf die EIIB- und EIIA-ähnlichen Domänen der Regulatoren konnte neben ManR und MtlR auch für LicR gezeigt werden (Joyet *et al.*, 2010; Sun und Altenbuchner, 2010; Tobisch *et al.*, 1997).

1.2.5 Die Katabolitrepression am Beispiel von MtlR aus *B. subtilis*

Die Katabolitrepression durch Glucose soll hier am Beispiel des PRD-haltigen Aktivators MtlR aus *B. subtilis*, der die Gene für den Mannitol-Stoffwechsel reguliert (Heravi *et al.*, 2011; Joyet *et al.*, 2010), kurz beschrieben werden. Zu unterscheiden sind die physiologischen Zustände, in denen (i) weder Mannitol noch Glucose (Basalexpression), (ii) nur Mannitol (Induktion) bzw. (iii) Mannitol und Glucose (Katabolitrepression) vorhanden sind (s. Abbildung 1–3):

i. **BASALEXPRESSION.** Sind keine PTS-Zucker vorhanden, befinden sich alle PTS-Komponenten in einem phosphorylierten Zustand. Die PRD2 von MtlR wird durch HPr-His-15~P und die EIIB- und EIIA-ähnlichen Domänen durch $EIIB^{Mtl}$~P phosphoryliert. MtlR ist inaktiv und es kommt evtl. zur Bindung an die Permease (Bouraoui *et al.*, 2013). Es findet somit nur die Basalexpression der Operon-Gene sowie von *mtlR* statt.

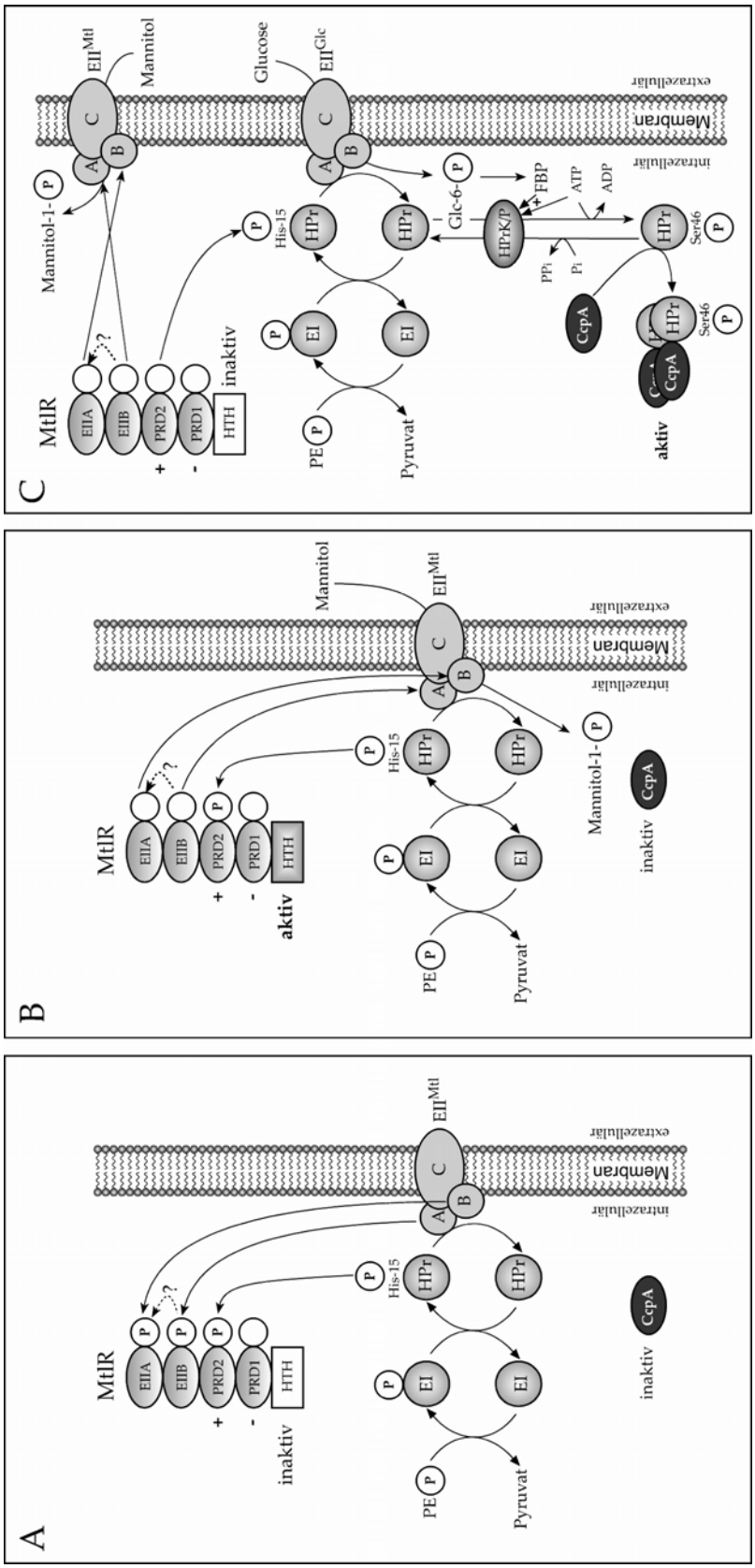


Abbildung 1-3: Regulationsmodell der Induktion und Katabolitrepression am Beispiel des Mannitol Transkriptionsaktivators MtlR von *B. subtilis* (nach Heravi *et al.*, 2011; Joyet *et al.*, 2010). (**A**) Sind keine PTS-Zucker vorhanden, sind alle PTS-Komponenten phosphoryliert; die PRD2 von MtlR wird durch HPr-His-15~P und die EIIB- und EIIA-Domänen durch P~EIIBA^{Mtl} phosphoryliert → MtlR inaktiv. (**B**) Mannitol wird über EII^{Mtl} aufgenommen; MtlR wird an den EIIBA-Domänen dephosphoryliert; die Phosphorylierung der PRD2 durch HPr-His-15~P aktiviert MtlR, welcher dimerisiert und an den Operator des *mtl* Operons bindet. (**C**) Sind Mannitol und Glucose vorhanden, phosphoryliert HPr-His-15~P bevorzugt EII^{Glc} und steht nicht mehr für die Phosphorylierung der PRD2 von MtlR zur Verfügung; auch die EIIBA-Domänen sind dephosphoryliert und MtlR damit inaktiv; intrazelluläre Spiegel von FBP und ATP steigen an und stimulieren die HPrK/P Kinase-Aktivität → HPr wird am Ser-46 phosphoryliert und bildet mit CcpA einen Komplex, der an die *cre*-Sequenz des *mtl* Operons bindet und zur Katabolitrepression führt.

ii. **INDUKTION.** Ist Mannitol vorhanden, wird es über EII^{Mtl} in die Zelle transportiert und dabei in Mannitol-1-phosphat umgewandelt. Die PRD2 wird durch HPr-His-15~P phosphoryliert, die EIIB- und EIIA-ähnlichen Domänen von MtlR übertragen ihre Phosphorylgruppen auf $EIIBA^{Mtl}$. MtlR ist aktiv, bindet an die Operatoren und induziert damit die Genexpression.

iii. **KATABOLITREPRESSION.** Sind Mannitol und Glucose vorhanden, sinkt aufgrund der hohen Umsatzrate von Glucose der intrazelluläre Spiegel an HPr-His-15~P ab, sodass die PRD2 von MtlR nicht mehr phosphoryliert wird. Ebenso sind seine EIIBA-Domänen dephosphoryliert, da sie ihre Phosphorylgruppen auf $EIIB^{Mtl}$ übertragen. Gleichzeitig steigen die intrazellulären Konzentrationen von FBP und ATP an, wodurch es zur Stimulierung der HPrK/P-Kinase-Aktivität kommt. HPrK/P phosphoryliert HPr (und Crh) unter ATP-Verbrauch am Ser-46. Es kommt zur Bildung des globalen CcpA-HPr(Crh)-Ser-46~P Komplexes, der an die *cre*-Sequenzen von *mtlR* und des *mtlAFD* Operons bindet und damit zur Repression der Genexpression führt.

1.3 Die Rolle der globalen Regulatoren CodY und TnrA

Damit *B. subtilis* auf verschiedene Nähstoffangebote reagieren kann, haben sich überlappende regulatorische Netzwerke entwickelt, die von diversen spezifischen Regulatoren sowie von den globalen Regulatoren CcpA, CodY und TnrA kontrolliert werden (Sonenshein, 2007). Dadurch kann die Balance zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus sowie zwischen Katabolismus und Anabolismus aufrechterhalten werden. Während CcpA vorwiegend die Expression von Genen des Kohlenstoffmetabolismus reguliert, spielt TnrA vor allem bei der Regulation von Genen des Stickstoffmetabolismus eine Rolle. CodY reguliert hingegen Gene aus beiden Stoffwechselzweigen. Im Falle des *ilv-leu* Operons wirken sogar alle drei Regulatoren gemeinsam (Tojo *et al.*, 2005). Wie bereits erwähnt, registriert CcpA mithilfe der HPrK/P die intrazellulären Konzentrationen von ATP und FBP und damit den Energiestatus der Zelle. CodY und TnrA reagieren ebenfalls auf die Anwesenheit bestimmter Metabolite und verändern dadurch ihre Aktivität.

Der globale Transkriptionsregulator CodY reguliert über 100 Gene und Operons in *B. subtilis*, die in der Regel in der Exponentialphase des Wachstums reprimiert und in der Stationärphase oder bei Nahrungsmangel induziert werden (Sonenshein, 2005). Dazu zählen u.a. Gene für die Motilität, Chemotaxis, Transportsysteme, extrazelluläre Enzyme, sowie Gene für Sporulation, Kompetenzausbildung und Virulenz (Bergara *et al.*, 2003; Molle *et al.*, 2003; Serror und Sonenshein, 1996; Sonenshein, 2005). Die Aktivität von CodY wird durch GTP und durch die verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin (= BCAAs für engl. *Branched-Chain Amino Acids*) beeinflusst, die direkt mit CodY interagieren (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001; Shivers und Sonenshein, 2004). GTP ist wie ATP ein Signal für einen hohen Energiespiegel in der Zelle. Aus BCAAs werden Pantothensäure, Coenzym A und verzweigtkettige Fettsäuren synthetisiert und werden mit Abstand am häufigsten in Proteine eingebaut. Damit stellen sie für die Zelle repräsentativ das gesamte Aminosäureangebot dar. So muss die Zelle nicht auf die Verfügbarkeit jeder einzelnen, sondern in erster Linie auf die am häufigsten benötigten Aminosäuren reagieren und kann so wertvolle Ressourcen sparen. CodY bindet an eine AT-reiche DNA-Region mit der Konsensussequenz 5′-AATTTTCWGAAAATT-3′ (Belitsky und Sonenshein, 2008), die jedoch sehr variabel ist und auch in dublizierter Form vorkommen kann (Belitsky und Sonenshein, 2011).

Gemeinsam mit CcpA ist CodY für die Regulation des sogenannten *Overflow*-Metabolismus in *B. subtilis* verantwortlich (s. Abbildung 1–4): Steht *B. subtilis* unter aeroben Bedingungen genügend Glucose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung kommt es zum bakteriellen Crabtree-Effekt bzw. zum *Carbon Overflow*: Damit die verfügbare Glucose schnell aufgenommen werden und die Glykolyse in einer hohen Geschwindigkeit ablaufen kann, muss der Cofaktor NAD^+ für die Aufnahme von Elektronen und Protonen in hohen Mengen und schnell regeneriert werden. Da der Citratzyklus NAD^+ nicht so schnell regenerieren kann, wird der Großteil der Glucose nur bis Pyruvat und Acetyl-CoA umgesetzt. Diese Metabolite werden wiederum in Nebenprodukte wie Lactat, Acetat und Acetoin umgewandelt, welche daraufhin ins extrazelluläre Medium abgegeben werden (Sonenshein, 2007). Dies ermöglicht der Zelle die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts bei gleichzeitiger ATP-

Produktion. Erst wenn die Glucose vollständig verbraucht ist, werden die gebildeten Nebenprodukte wieder aufgenommen. In *B. subtilis* erfolgt diese Koordination des Stoffwechsels durch CcpA und CodY. Ersterer wird durch die intrazelluläre Erhöhung von ATP und FBP aktiviert. Durch Bildung von Valin aus Pyruvat bzw. Isoleucin aus Oxalacetat und GTP aus ATP erfolgt eine Aktivierung von CodY. Während CcpA und CodY die Expression der Gene für die Nebenproduktbildung aktivieren, reprimieren beide Regulatoren die Expression der Gene für die Wiederverwertung der Nebenprodukte und einiger Enzyme des Citratzyklus (Sonenshein, 2007).

TnrA ist der globale Transkriptionsregulator des Stickstoffmetabolismus in *B. subtilis*, der an die Konsensussequenz 5′-TGTNAN$_7$TNACA-3′ bindet (Wray, Jr. *et al.*, 1997; Wray, Jr. *et al.*, 2000). Er ist aktiv, wenn die primären Stickstoffquellen Glutamin und Ammonium nicht vorhanden sind. In diesem Fall reprimiert TnrA die Expression der Gene für die Glutamin-Synthetase (GS; *glnA*) und die Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT; *gltAB*). Gleichzeitig aktiviert TnrA Gene und Operons, die für die Aufnahme und Verstoffwechselung von sekundären Stickstoffquellen wie Nitrat oder Nitrit verantwortlich sind (Wray, Jr. *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2003). Sind die primären Stickstoffquellen Glutamin und Ammonium jedoch vorhanden, wird TnrA durch Bildung eines ternären Komplexes aus TnrA, Glutamin und GS inaktiviert (Wray, Jr. *et al.*, 2001).

GS und GOGAT werden für die Stickstoff- bzw. Ammonium-Assimilation benötigt und verknüpfen den Kohlenstoff- mit dem Stickstoffmetabolismus (s. Abbildung 1–4). Neben TnrA haben aber auch CcpA und CodY regulatorischen Einfluss auf die GOGAT-Aktivität.

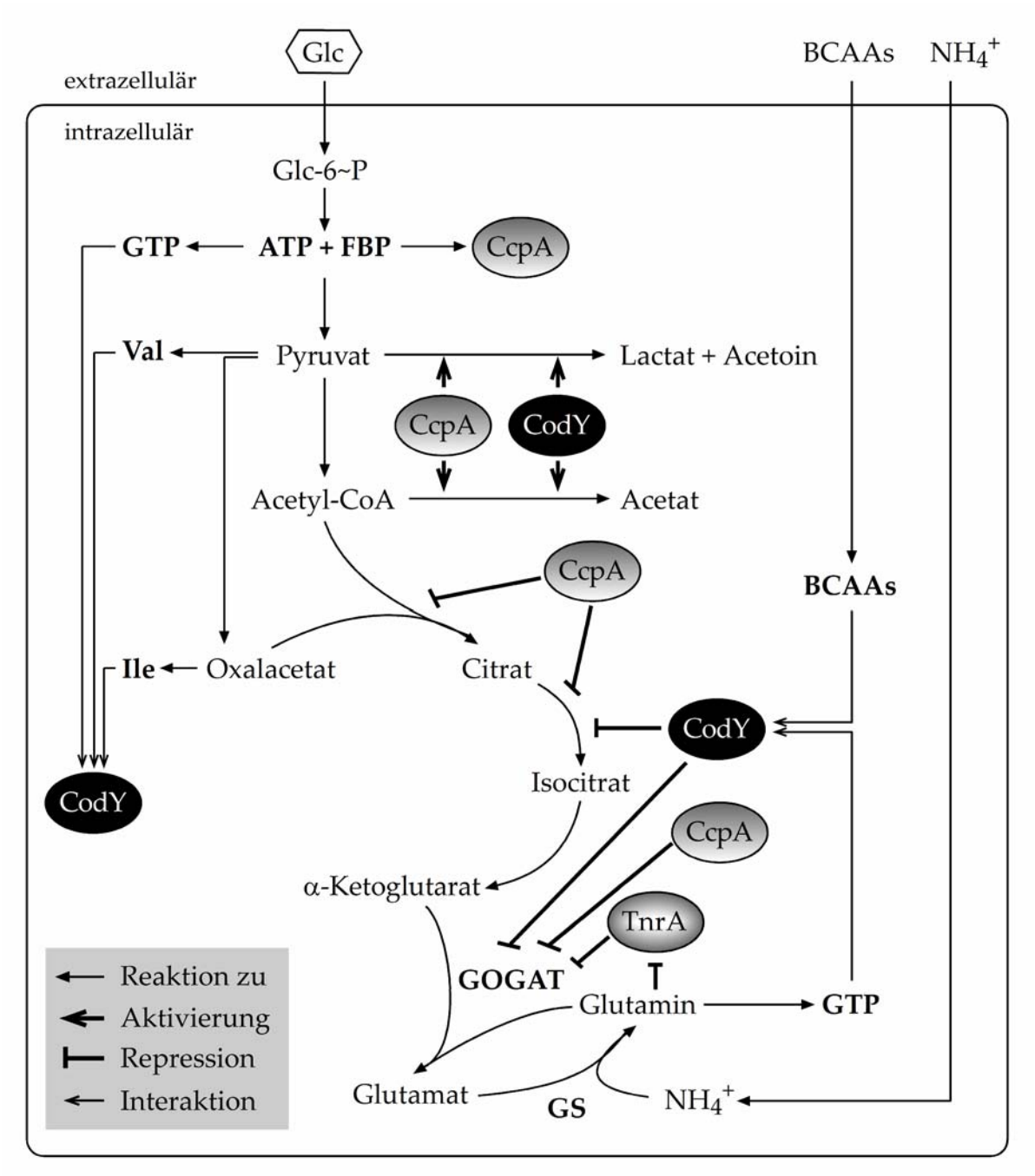


Abbildung 1-4: Zusammenspiel der globalen Regulatoren CcpA, CodY und TnrA im Kohlen- und Stickstoffmetabolismus von *B. subtilis* (nach Brinsmade *et al.*, 2010; Sonenshein, 2007). CcpA wird indirekt durch steigende Konzentrationen an ATP und Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) aktiviert. CodY wird durch direkte Bindung von GTP und verzweigtkettiger Aminosäuren (BCAAs) aktiviert. TnrA wird in Anwesenheit von Glutamin und Ammonium (NH_4^+) durch Bindung an die Glutamin-Synthetase (GS) inaktiviert. GOGAT = Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase.

1.4 Das D-Mannose-Expressionssystem

Für die Produktion homo- bzw. heterologer Proteine in *B. subtilis* werden leistungsstarke Expressionssysteme benötigt. Neben konstitutiven Promotoren wie P_{lapA}, P_{veg} oder P_{43} (Ming *et al.*, 2010; Moran, Jr. *et al.*, 1982; Nguyen *et al.*, 2005) kommen Promotoren zum Einsatz, die entweder positiv oder negativ reguliert sind. Dazu gehören u.a. der durch Hitze, Säure oder Ethanol induzierbare P_{gsiB}, die IPTG-induzierbaren Promotoren P_{spac} und P_{groE} sowie die durch Xylose, Mannose bzw. Mannitol induzierbaren Promotoren P_{xylA}, P_{manP} und P_{mtlA} (Heravi *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2005; Sun und Altenbuchner, 2010). In jedem Fall ist eine möglichst geringe Basalexpression wünschenswert, v.a. wenn die Expression nicht zu früh starten darf (z.B. bei der Produktion toxischer Proteine). Bei Vektoren mit hoher Kopienzahl, kann dies leichter durch eine positive Regulation erreicht werden als durch eine negative, da oftmals die Menge der Repressoren nicht ausreicht, um alle Operatoren zu binden. Auf der anderen Seite benötigt man für eine effiziente Expression eines positiv regulierten Systems eine ausreichende Menge an Aktivatoren. Häufig müssen deshalb die Gene für die Regulatoren zusätzlich auf dem Expressionsvektor gestellt werden. Der Einsatz von Expressionsvektoren erfordert eine genaue Kenntnis über die Regulationsvorgänge im Wirtsorganismus, wie z.B. über die Katabolitrepression durch Glucose. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von Expressionssystemen ist die Wirtschaftlichkeit, d.h. die benötigte Menge und der Preis des Induktors spielen bei der Entwicklung solcher Systeme eine wichtige Rolle.

1.4.1 Das *manPA-yjdF* Operon aus *B. subtilis*

Ähnlich wie D-Glucose wird D-Mannose von *B. subtilis* über einen PTS-Transporter (EII^{Man}) aufgenommen und dabei zu Mannose-6-phosphat phosphoryliert (Reizer *et al.*, 1999). Dieses wird zu Fructose-6-phosphat isomerisiert, welches weiter über die Glykolyse abgebaut wird. Dabei wird wiederum das für das PTS benötigte PEP generiert. Die Gene für den Mannose-Abbau sind in einem Operon organisiert, das aus *manP*, *manA* und dem distal gelegenen Gen *yjdF* besteht (Abbildung 1–5, Sequenz s. Anhang). Diese codieren für den PTS-Transporter, die Mannose-6-phosphat-Isomerase und eine strukturierte, nicht-codierende RNA mit unbekannter

Funktion (Kunst *et al.*, 1997; Nicolas *et al.*, 2012; Sun und Altenbuchner, 2010; Weinberg *et al.*, 2010). Die Deletion von *yjdF* hat keinen phänotypischen Einfluss auf die Verwertung der D-Mannose als Kohlenstoff- und Energiequelle (Sun und Altenbuchner, 2010). Das Operon wird durch den PRD-haltigen Transkriptionsaktivator ManR reguliert, dessen Gen unmittelbar stromaufwärts und in gleicher Orientierung liegt und ebenfalls von ManR reguliert wird (Reizer *et al.*, 1999; Sun und Altenbuchner, 2010).

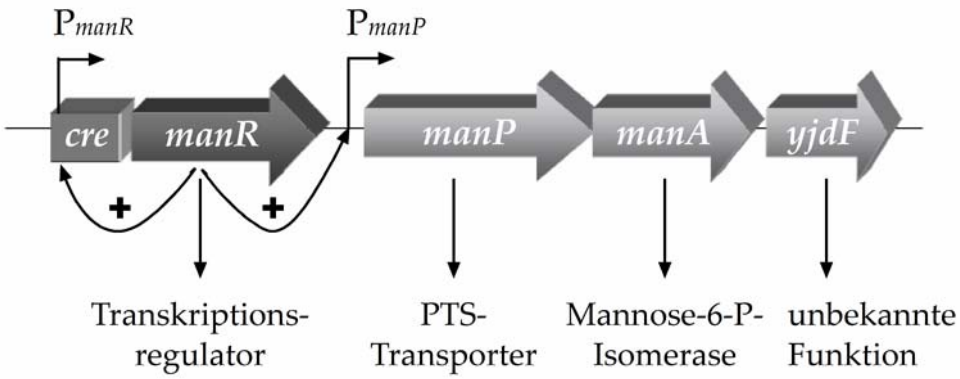


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des mutmaßlichen Regulons von ManR (verändert nach Wenzel *et al.*, 2011). Gezeigt ist die Lage der Gene des *manPA-yjdF*-Operons und des Regulatorgens *manR*. Die *cre*-Sequenz ist als Box symbolisiert. Der positive, regulatorische Einfluss des Transkriptionsregulators ManR auf die Promotoren P_{manR} und P_{manP} ist gekennzeichnet.

1.4.2 Der Transkriptionsaktivator ManR

Der Regulator ManR besteht aus 648 Aminosäuren (ca. 75 kDa) und hat einen pI-Wert von 8,15. Er ist aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne mit zwei Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiven, gefolgt von regulatorischen Domänen, nämlich PRD1, PRD2 sowie einer $EIIB^{Bgl}$- und $EIIA^{Fru}$-ähnlichen Domäne, aufgebaut (Abbildung 1–6)[5, 6]. Die strukturelle Ähnlichkeit von ManR mit den PRD-haltigen Aktivatoren MtlR aus *Geobacillus stearothermophilus* (Henstra *et al.*, 2000) bzw. LicR und MtlR aus *B. subtilis* (Joyet *et al.*, 2010; Tobisch *et al.*, 1997) lassen darauf schließen, dass seine

[5] PFAM-Datenbank-Eintrag: http://pfam.sanger.ac.uk/protein/O31644

[6] UniProt-Datenbank-Eintrag: http://www.uniprot.org/uniprot/O31644

Aktivität ebenfalls über die Phosphorylierung seiner konservierten Aminosäuren in den PRDs und EIIBA-ähnlichen Domänen moduliert wird. Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass ManR in den PRDs jeweils zwei konservierte Histidine (His-222 / His-281 bzw. His-334 / His-393), in der $EIIB^{Bgl}$-Domäne ein konserviertes Cystein (Cys-415) und in der $EIIA^{Fru}$-Domäne ein konserviertes Histidin (His-570) als potentielle Phosphorylierungsstellen besitzt (Greenberg *et al.*, 2002).

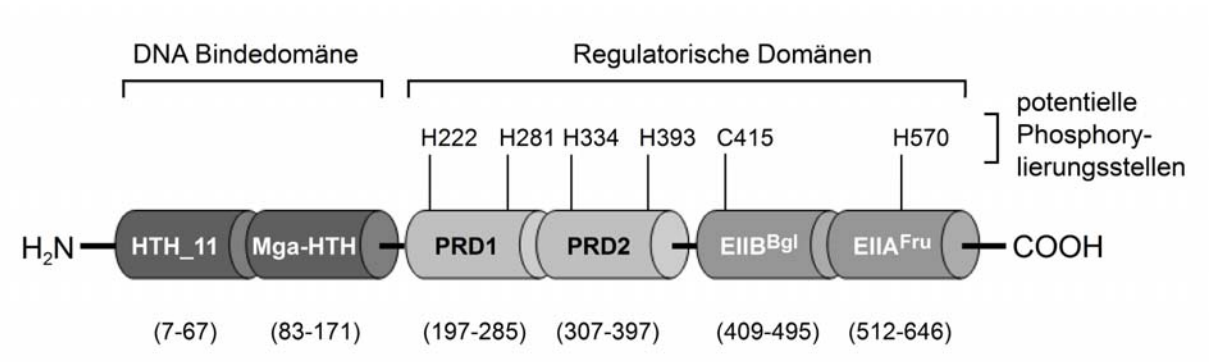


Abbildung 1-6: Domänenstruktur des Transkriptionsaktivators ManR aus *B. subtilis*. Die potentiellen Phosphorylierungsstellen, sowie die Lage der einzelnen Domänen sind gekennzeichnet. Erklärung der DNA-Bindedomäne: HTH_11 (PFAM Accession Number PF08279) = Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotiv mit Loop aus kleinen β-Sheets (Gajiwala und Burley, 2000); Mga-HTH (PFAM Accession Number PF05043) = Helix-Turn-Helix-DNA-Bindedomäne, die im Zentrum des Mga-Regulators aus *Streptococcus pyogenes* vorkommt (McIver und Myles, 2002).

ManR aktiviert die Transkription ausgehend von den Promotoren des Regulatorgens (P_{manR}) und des *manPA-yjdF* Operons (P_{manP}), führt jedoch zu unterschiedlichen Erhöhungen der Expressionsraten in Anwesenheit von Mannose (Sun und Altenbuchner, 2010). Dabei ist die Expression ausgehend von P_{manP} stärker ausgeprägt. Da die Bindestellen von ManR (Operatoren) mittels Deletionsanalysen nur grob lokalisiert werden konnten (Sun und Altenbuchner, 2010), kann über den Aktivierungsmechanismus von ManR bislang nur gemutmaßt werden. Aufgrund der identifizierten *Inverted Repeats* (= sich gegenläufig wiederholende Sequenzen) wird jedoch eine Klasse II Aktivierung vermutet. Eine Aktivierung der Klasse I sowie eine Aktivierung über Konformationsänderung der Promotorregion kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Browning und Busby, 2004): Bei einem Promotor

der Klasse I binden die Regulatorproteine an Sequenzen, die stromaufwärts der -35-Region liegen, und rekrutieren die RNA-Polymerase durch Interaktion mit deren α-C-terminalen Domäne, wie im Falle von CRP (cAMP-Rezeptorprotein) und dem *lac* Promotor in *E. coli* (Ebright, 1993). Bei einem Promotor der Klasse II überlappt die Bindestelle mit der -35-Region und die Aktivierung erfolgt durch Interaktion des Regulators mit der Domäne 4 der σ Untereinheit der RNA-Polymerase, wie im Falle des cI Proteins und P_{RM} Promotors des Bakteriophagen λ (Nickels *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung ist die Umstrukturierung der Promotorelemente durch Bindung des Regulators in deren unmittelbarer Nähe. Dadurch werden diese so angeordnet, dass die RNA-Polymerase (besser) binden kann. Auf diese Weise agieren z.B. die Mitglieder der MerR-Regulatorfamilie (Brown *et al.*, 2003).

1.4.3 Anwendbarkeit in der Hochzelldichtefermentation

Der starke Promotor P_{manP} und die positive Regulation durch ManR prädestinieren dieses System für den Einsatz in Expressionsvektoren. Es konnte gezeigt werden, dass durch die positive Feedback-Kontrolle der ManR-Expression die chromosomale Kopie von *manR* ausreicht, um genügend ManR-Moleküle zu bilden, die selbst bei hoher Kopienzahl des Vektors alle Operatoren besetzen und die Expression induzieren können (Sun und Altenbuchner, 2010; Wenzel, 2009). Bei der Anwendung dieses Systems in Hochzelldichtefermentation mit *B. subtilis* zeigte sich, dass Mannose sehr schnell verstoffwechselt wird und damit nicht sehr lange als Induktor zur Verfügung steht (Wenzel, 2009). Da der gegenwärtige Preis von D-Mannose mit ca. 1 € g^{-1} (Quelle: Fa. Sigma-Aldrich; Artikelnummer 63580-100G) relativ hoch ist, ist dieses System in dieser Form nicht wirtschaftlich. Erste Stammoptimierungen, um den Abbau des Induktors zu verhindern oder zumindest zu reduzieren, blieben bislang ohne den erhofften Erfolg (Wenzel, 2009).

1.5 Die Hochzelldichtefermentation

Primäres Ziel eines industriellen Prozesses ist eine hohe Produktivität, d.h. in einem definierten Produktionsvolumen soll die gebildete Produktmenge pro Zeiteinheit und Zellmasse möglichst hoch sein. Ist die genetische Optimierung des Expressionssystems ausgereizt, kann die Produktivität nur noch proportional zur gebildeten Biomassekonzentration weiter gesteigert werden. Die meisten Studien bzgl. Hochzelldichtefermentationen wurden mit *E. coli* durchgeführt und dabei bis zu 190 g (Trockengewicht) l^{-1} erreicht (Lee, 1996; Shiloach und Fass, 2005; Wilms *et al.*, 2001). Mit *B. subtilis* sind solche hohen Werte aber eher die Ausnahme (Park *et al.*, 1992).

In der Bioreaktionstechnik unterscheidet man drei grundlegende Betriebsweisen für die Reaktorführung. Die Auswahl erfolgt dabei je nach den Bedürfnissen der Mikroorganismen und nach Ziel des Prozesses:

i. **BATCH-BETRIEB.** Bei dieser Betriebsart bleibt das Kulturmedium über den gesamten Zeitraum hinweg unangerührt. Er wird häufig im Labor angewendet, wenn eine rasche Biomasseentwicklung bei einfacher Apparatur gewünscht ist, und die Produktbildung unabhängig von der Wachstumsphase stattfinden kann.

ii. **FED-BATCH-BETRIEB.** Hier wird durch Substratzufütterung (*Feed*) im Anschluss an die Batch-Phase der Übergang von der Exponential- zur Stationärphase verlängert. Dadurch können hohe Endkonzentrationen an Biomasse und Produkt erreicht werden. Häufig findet die Produktbildung nur in der Zufütterungsphase statt, da hier in Abhängigkeit von der Zulaufrate eine konstante Wachstumsgeschwindigkeit eingestellt werden kann.

iii. **KONTINUIERLICHER BETRIEB.** Bei dieser Form der Betriebsführung wird am Ende der Batch-Phase sowohl Substrat zugefüttert als auch Kulturmedium in gleichem Maße wieder abgeführt. Ist die Durchflussrate kleiner als die Wachstumsrate, stellt sich ein Fließgleichgewicht ein, d.h. die Zelldichte bleibt konstant (**Chemostat**). Dieses Verfahren wird gewählt, um physiologische Zustände zu untersuchen, aber auch um zu verhindern, dass sich toxische Produkte anhäufen können.

Um Hochzelldichten im Bioreaktor zu erreichen, wird der Fed-Batch-Betrieb verwendet (Abbildung 1–7). Dieser unterteilt sich in eine Batch- und eine Zufütterungsphase. In der Zufütterungsphase wird das zugefütterte Substrat sofort von den Zellen aufgenommen und verstoffwechselt, sodass die Substratkonzentration im Bioreaktor gleich null ist. Eine Erhöhung der Zulaufrate des Feeds, die über eine Kontrolleinheit gesteuert und reguliert wird, führt zu einer Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit bis zur maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max}. Eine weitere Erhöhung der Zulaufrate würde zu einer Akkumulation des Substrats im Bioreaktor führen.

Die Zulaufrate richtet sich nach der Biomasse im Reaktor am Ende der Batch-Phase ($\mathbf{c_X^0}$) und der Substratkonzentration im Feed ($\mathbf{c_S^0}$). Unter Einbeziehung der Biomasse- und Substrat-Bilanzen ergibt sich für die Zulaufrate **F(t)** folgende Beziehung:

$$F(t) = \frac{\mu}{c_S^0 \cdot Y_{X/S}} \cdot V^0 \cdot c_X^0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad [\text{in l h}^{-1}]$$

mit $Y_{X/S}$ = spezifischer Ausbeutekoeffizient von Biomasse X zu Substrat S [in g g^{-1}]

c_X^0 = Biomassekonzentration zu Beginn der Zufütterungsphase [in g l^{-1}]

V^0 = Reaktorvolumen zu Beginn der Zufütterungsphase [in l]

c_S^0 = Glucose-Konzentration in der Feedlösung [in g l^{-1}]

t = Zeit [in h]

μ = spezifische Wachstumsrate [in h^{-1}]

Wählt man eine konstante Zulaufrate, nimmt anhand der obigen Gleichung die spezifische Wachstumsrate μ kontinuierlich ab. Möchte man jedoch eine bestimmte, konstante spezifische Wachstumsrate $\mu \leq \mu_{max}$ während der gesamten Zufütterungsphase aufrechterhalten, muss die Zulaufrate exponentiell über das Leitsystem des Bioreaktors gesteigert werden.

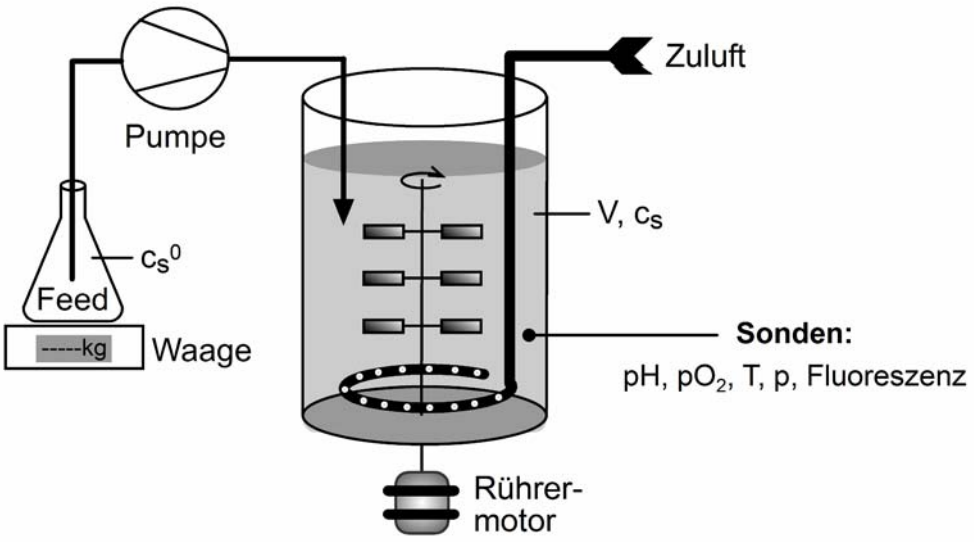


Abbildung 1-7: Darstellung eines Bioreaktors für den Fed-Batch-Betrieb. Die Zufütterung der Feed-Lösung mit der Substratkonzentration c_S^0 erfolgt über eine Pumpe, die über ein Leitsystem gesteuert wird. Die Regulierung der Zulaufrate erfolgt durch Abgleich mit den Waagen-Werten. Im Bioreaktor sind Sonden zur Überwachung des pH, Sauerstoffpartialdrucks pO_2, der Temperatur T, des Drucks p und ggf. der Fluoreszenz vorhanden. Die Verteilung der Zuluft und der zugefütterten Substratlösung erfolgt über den Rührer, dessen Geschwindigkeit ebenfalls über das Leitsystem gesteuert wird.

Neben der Hochzelldichte und Einstellbarkeit der spezifischen Wachstumsrate μ weist das Fed-Batch-Verfahren noch weitere Vorteile auf:

(i) Durch die Glucose-Limitierung werden Substratüberschusshemmungen verhindert, die sonst das Wachstum negativ beeinflussen würden.

(ii) Ausbeuteverluste durch den bakteriellen Crabtree-Effekt, bei dem unter aeroben Bedingungen u.a. Acetat als *Overflow*-Produkt aus Glucose gebildet wird (Doelle *et al.*, 1982; Sonenshein, 2007), werden – zumindest in der Zufütterungsphase – verhindert.

1.6 Zielsetzungen

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Charakterisierung des Transkriptionsaktivators ManR von *B. subtilis*. Vorangegangene Arbeiten scheiterten an der Produktion von aktiven ManR-Molekülen für weiterführende *in vitro* Versuche. Daher sollte zunächst ein Weg gefunden werden, aktive ManR-Moleküle in ausreichender Menge zu produzieren. Ausgehend davon sollten die DNA-Bindestellen und allgemeinen Bindeeigenschaften von ManR bestimmt werden. Die Regulation der Aktivität von ManR sollte durch Mutagenese des Regulators näher untersucht werden.

Das Mannose-Expressionssystem wurde schon zuvor in Hochzelldichtefermentationen mit *B. subtilis* erprobt, zeigte jedoch Verbesserungsbedarf bezüglich Induktorverbrauch, Ausbeute, Produktivität und Vektorstabilität. Als weiteres Ziel sollte daher dieses System mit Blick auf eine industrielle Anwendung zur Produktion heterologer Proteine mit *B. subtilis* unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten optimiert werden. Gentechnische Veränderungen des Wirtsstammes sowie der Expressionsvektoren sollten vorgenommen werden, um den Induktorverbrauch auf ein Minimum zu senken, und um die segregative sowie strukturelle Stabilität der Vektoren zu steigern.

Der bei der Kultivierung der Vorkulturen für die Fermentation festgestellte, positive Effekt der Spurenelemente sowie der negative Effekt der Casamino Acids auf die Expression des verwendeten Reportergens (*eGFP*) sollte untersucht werden. Ferner sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern sich Mannose-haltiger Hefeextrakt als kostengünstigere Induktoralternative eignet.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 2-1: Verwendete und konstruierte Bakterienstämme mit relevantem Genotyp.

Erklärung der Resistenzgene: *ermC* = Erythromycin; *cat* = Chloramphenicol; *aad9* = Spectinomycin

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
Escherichia coli		
JM109	*recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk^-, mk^+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB)*, F`*[traD36, proAB, $lacI^q$ lacZ ΔM15]*	Yanisch-Perron *et al.*, 1985
NM538	F^- *supF hsdR mcrB* λ^-	Frischauf *et al.*, 1983
Bacillus subtilis - Fremdstämme		
3NA	*spo0A3*	Michel und Millet, 1970
TQ276	*spo0A3 ΔmanR::ermC*	Sun und Altenbuchner, 2010
TQ281	*spo0A3 ΔmanA::ermC*	Sun und Altenbuchner, 2010
TQ356	*spo0A3 ΔmanP::ermC*	Sun und Altenbuchner, 2010
Bacillus subtilis - in dieser Arbeit konstruierte Stämme		
MW 437	*spo0A3 ΔgmuREFG::cat*	
MW 678	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC*	
MWZ 9	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-repA ΔmanP::ermC*	
MWZ 14	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-repA ΔmanP::ermC ΔalrA*	
MWZ 15	*spo0A3 ΔmanP::ermC ΔalrA*	
MWZ 16	*spo0A3 ΔmanP::ermC ΔtnrA*	
MWZ 34	*spo0A3 ΔmanP::ermC ΔcodY*	
MWZ 35	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::manR-aad9*	
MWZ 37	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{H222A}$*-aad9*	
MWZ 38	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{C415A}$*-aad9*	
MWZ 39	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{C415D}$*-aad9*	
MWZ 40	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{H393D}$*-aad9*	
MWZ 41	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{H334A\ H393A}$*-aad9*	
MWZ 42	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{H334D\ H393D}$*-aad9*	
MWZ 43	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{H570D}$*-aad9*	
MWZ 44	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{H393A}$*-aad9*	
MWZ 45	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{H281A}$*-aad9*	
MWZ 46	*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-lacZ ΔmanR::ermC amyE::*$manR_{H334A}$*-aad9*	

Fortsetzung Tabelle 2-1.

Stamm	Relevanter Genotyp
Bacillus subtilis - in dieser Arbeit konstruierte Stämme	
MWZ 47	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{H570A}$-*aad9*
MWZ 48	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{C415A\ H570A}$-*aad9*
MWZ 49	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{H222A\ H281A}$-*aad9*
MWZ 50	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{C415D\ H570D}$-*aad9*
MWZ 52	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{H334D}$-*aad9*
MWZ 54	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{400}$(ΔEIIBA)-*aad9*
MWZ 55	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{495}$(ΔEIIA)-*aad9*
MWZ 58	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{H281D}$-*aad9*
MWZ 68	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{H222D}$-*aad9*
MWZ 69	*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*lacZ* Δ*manR::ermC amyE::manR*$_{H222A\ H281D}$-*aad9*

2.1.2 Plasmide

In Tabelle 2–2 sind die verwendeten, nicht-selbstständig hergestellten Plasmide mit Referenz aufgelistet. Tabelle 2–3 gibt eine Übersicht über die Konstruktion, der in dieser Arbeit selbstständig hergestellten Plasmide. Relevante Plasmidkarten sind entweder in den jeweiligen Kapiteln oder im Anhang skizziert. Um eine Redundanz zu vermeiden, wurden Derivate bestimmter Vektoren, wie z.B. die der *manR*-Vektoren, nicht extra skizziert.

Tabelle 2-2: Verwendete Plasmide mit relevanten Eigenschaften. Abk.: KV, Klonierungsvektor; IV, Integrationsvektor; EV, Expressionsvektor; SV, Shuttlevektor; ts, temperatursensitiv; Ap, Ampicillin; Cm, Chloramphenicol; Tc, Tetracyclin; Em, Erythromycin; Sp, Spectinomycin; Km, Kanamycin; n.v., nicht veröffentlicht; P_{manP}*, mutierter *manP* Promotor.

Name	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pACYC184	KV für *E. coli* mit niedriger Kopienzahl	Cm; Tc	Chang und Cohen, 1978
pDG1730	IV für *B. subtilis* (*amyE*-Lokus)	Sp, Em, Ap	Guerout-Fleury *et al.*, 1996
pE194^{ts}	ts-Vektor für *B. subtilis*	Em	Gryczan *et al.*, 1982
pHM30	IV für *B. subtilis* (*his*-Lokus)	Ap, Sp	Motejadded und Altenbuchner, 2007
pHM31	KV für *B. subtilis* (*his*-Lokus)	Ap	Motejadded und Altenbuchner, 2007
pHM95	pBS72-SV für *E. coli* & *B. subtilis*	Ap, Cm	Motejadded, H.; n.v.
pIC20HE	KV für PCR-Produkte	Ap	Altenbuchner *et al.*, 1992
pJOE4396.1	EV für *B. subtilis*; P_{gutB}-*eGFP*, *gutR*	Ap, Km	Altenbuchner, n.v.
pJOE4786.1	KV für PCR-Produkte	Ap	Jeske und Altenbuchner, 2010
pJOE6244.2	pUB110-SV für *E. coli* & *B. subtilis*	Ap, Km	Altenbuchner, J.; n.v.
pJOE6732.1	instabiler EV für *B. subtilis*; P_{xylAB}-*P1-cre*	Ap, Sp	Altenbuchner,J.; n.v.
pKAM20	IV mit *ermC* und Polylinker flankiert von *mrpS*/*loxP*-Sequenzen	Ap, Em	Morabbi-Heravi, K.; n.v.
pSUN063.11	*manR*-P_{manR}-*lip*	Ap	Sun und Altenbuchner, 2010
pSUN202.4	pUB110-SV für *E. coli* & *B. subtilis*; P_{manP}	Ap, Km	Sun, T.; n.v.
pSUN246.1	EV für *E. coli*; *rhaP*$_{BAD}$-*manR-strep*	Ap	Sun, 2009
pSUN266.1	pUC18-Derivat mit Integrationsstelle zwischen *ter*-Sequenzen	Sp, Ap	Sun, T.; n.v.
pSUN282	IV für *manA*-Deletion in *B. subtilis*	Sp, Em, Ap	Sun, 2009
pSUN290	pBS72-EV für *B. subtilis*; P_{manP}-*lacZ*	Sp	Sun und Altenbuchner, 2010
pSUN291	pBS72-EV für *B. subtilis*; P_{manR}-*lacZ*	Sp	Sun und Altenbuchner, 2010
pSUN311.1	EV für *B. subtilis*; P_{manP}-*strep-manR*	Ap, Km	Sun, 2009
pSUN351.3	Vektor mit P_{manR} und P_{manP} für die Sanger-Sequenzierung (ALFexpress)	Ap	Sun, T.; n.v.
pSUN356.7	IV für *manP*-Deletion in *B. subtilis*	Sp, Em, Ap	Sun und Altenbuchner, 2010
pSUN380.1	EV für *B. subtilis* mit P_{manP}*-*lacZ*	Sp	Sun und Altenbuchner, 2010
pSUN381.1	EV für *B. subtilis* mit P_{manP}*-*lacZ*	Sp	Sun und Altenbuchner, 2010
pSUN383.1	EV für *B. subtilis*; P_{manR}-*manR-strep*	Sp	Sun, 2009
pSUN390.1	EV für *E. coli*; *rhaP*$_{BAD}$-*manR-his*$_6$	Ap	Sun, 2009
pUB_ManP_ *strep*_GFPuv	SV für *E. coli* & *B. subtilis* (pUB110) mit P_{manP}-*strep-GFPuv*	Ap, Km	GENEART AG (Regensburg)
pUC18	KV für PCR-Produkte	Ap	Yanisch-Perron *et al.*, 1985
pWA21	EV für *E. coli*; *rhaP*$_{BAD}$-*his*$_6$-*eGFP*	Ap	(Wegerer *et al.*, 2008)

Tabelle 2-3: Konstruktionstabelle der in dieser Arbeit entstandenen Plasmide. Erklärung: Komplementäre Oligonukleotide: s….+ s….; PCR: s…./s…. (Template-DNA); *Overlap Extension*-PCR: s…./s….-s…./s…. (Template-DNA), Primer für Fusion der PCR-Produkte sind unterstrichen; Abk.: AP, Alkalische Phosphatase; Ap, Ampicillin; Bs3NA, chromosomale DNA von *B. subtilis* 3NA; Cm, Chloramphenicol; Em, Erythromycin; Km, Kanamycin; Sp, Spectinomycin. (*) s. Wenzel (2009)

Name	Insert		Vektor		Resistenz
pMW37.1*	s5019 + s5020	-	pWA21	AflII BamHI	Ap
pMW66.1*	pMW37.1	HindIII XbaI	pSUN202.4	HindIII XbaI	Ap
pMW93.1*	pSUN266.1	HindIII MunI	pUC18	HindIII EcoRI	Sp, Ap
pMW104.2*	-	-	pMW93.1	SfoI BspHI Klenow dNTPs	Sp
pMW108.1*	s5131/s5133 (pHM95)	SalI EcoRI	pHM95	SalI EcoRI	Ap, Cm
pMW116.15*	s5139/s5156 (pMW66.1)	BclI	pMW104.2	BamHI AP	Sp
pMW147.13*	pHM95	BsrBI EcoRI	pMW116.15	BsrBI EcoRI	Sp
pMW155.1*	pMW66.1	HincII EcoRI	pMW116.15	BsrBI EcoRI	Sp
pMW163.2*	s5234/s5235 (pMW155.1)	BsrBI EcoRI	pMW116.15	BsrBI EcoRI	Sp
pMW168.1*	s5236 + s5237	-	pMW163.2	AflII BamHI	Sp
pMW169.1*	s5245 + s5246	-	pMW163.2	AflII BamHI	Sp
pMW173.1*	s5243 + s5244	-	pMW169.1	AflII BglII	Sp
pMW206.1*	pMW168.1	AflII BsrGI	pMW147.13	AflII BsrGI	Sp
pMW219.1*	pMW108.1	EcoRI XhoI	pMW147.13	EcoRI XhoI	Sp
pMW229.2*	s5432/s5433 (pUC18)	XhoI PmeI	pMW219.1	XhoI PmeI	Sp
pMW237.1*	s5434/s5437 (pHM95)	BamHI SalI	pHM95	BglII SalI	Ap, Cm
pMW249.13*	pJOE4396.1	BsrGI ScaI	pMW229.2	BsrGI PvuII	Sp
pMW250.1*	pMW237.1	NsiI XhoI	pMW229.2	NsiI XhoI	Sp
pMW258.1*	pMW249.13	AgeI BsrGI	pMW168.1	AgeI BsrGI	Sp
pMW263.3*	pUB_ManP_ *strep*_GFPuv	HindIII MunI	pJOE6244.2	HindIII MunI	Ap, Km
pMW278.1*	pMW258.1	HindIII XbaI	pSUN202.4	HindIII XbaI	Ap, Km
pMW285.1*	-	-	pMW278.1	NheI XbaI	Ap, Km
pMW324.2*	pMW263.3	SnaBI XmaI	pSUN282	EcoRV XmaI	Ap, Km, Sp
pMW327.2*	s5617/s5426-s5683/s5620 (Bs3NA)	KasI EcoRI	pUC18	KasI EcoRI	Ap
pMW329.3*	-	-	pHM95	ClaI XhoI Klenow dNTPs	Ap, Cm
pMW333.1*	pMW327.2	KasI MscI	pMW324.2	KasI MscI	Ap, Km, Sp
pMW338.1*	pMW329.3	AflII PvuII	pMW333.1	AflII SmaI	Ap, Cm, Sp

Fortsetzung Tabelle 2-3.

Name	Insert		Vektor		Resistenz
pMW344.2	s5868/s5869 (Bs3NA)	AflII KasI	pMW338.1	AflII KasI	Ap, Cm, Sp
pMW356.1	s5867/s5624 (Bs3NA)	Klenow dNTPs	pJOE4786.1	EcoRV	Ap
pMW363.1	pMW356.1	BglII EcoRI	pMW344.2	BglII EcoRI	Ap, Sp
pMW376.8	pSUN063.11	NcoI PmeI Klenow dNTPs	pJOE4786.1	EcoRV	Ap
pMW388.1	s5996/s5997 (Bs3NA)	Klenow dNTPs	pJOE4786.1	EcoRV	Ap
pMW389.1	s5998/s5999 (Bs3NA)	Klenow dNTPs	pJOE4786.1	EcoRV	Ap
pMW391.1	pMW389.1	BglII EcoRI	pMW363.1	BglII EcoRI	Ap
pMW394.1	s6105/s6106 (Bs3NA) + s6075/s6076-s6077/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI AgeI MunI	pMW376.8	AgeI MunI	Ap
pMW401.1	s6105/s6158-s6159/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW376.8	AgeI MunI	Ap
pMW402.1	s6105/s6160-s6161/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW376.8	AgeI MunI	Ap
pMW403.1	s6105/s6164-s6165/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW376.8	AgeI MunI	Ap
pMW404.1	s6165/s6166-s6167/s6168 (Bs3NA-pMW376.8)	MunI BglII	pMW376.8	MunI BglII	Ap
pMW407.1	s6105/s6171-s6163/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW376.8	AgeI MunI	Ap
pMW408.3	s6154/s6155-s6156/s6157 (pMW376.8-Bs3NA)	AgeI NdeI	pMW376.8	AgeI NdeI	Ap
pMW409.3	pMW388.1	AflII NdeI	pMW363.1	AflII NdeI	Ap
pMW420.1	s6105/s6171-s6163/s6078 (pMW402.1-Bs3NA)	AgeI MunI	pMW376.8	AgeI MunI	Ap
pMW431.10	pMW376.8	NheI BglII	pMW363.1	NheI BglII	Ap, Sp
pMW436.1	s6105/s6158-s6159/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW408.3	AgeI MunI	Ap
pMW437.1	pMW391.1	NheI EcoRI	pMW409.3	NheI EcoRI	Ap

Fortsetzung Tabelle 2-3.

Name	Insert		Vektor		Resistenz
pMW467.1	pMW404.1	MunI BglII	pMW403.1	MunI BglII	Ap
pMW483.1	-	-	pMW206.1	XhoI ClaI Klenow dNTPs	Sp
pMW498.5	s6447/s6448 (pMW285.1)	XhoI	pIC20HE	XhoI	Ap, Km
pMW504.7	s6518/s6519 (Bs3NA)	NotI BamHI	pMW498.5	NotI BamHI	Ap, Km
pMW506.1	s6491/s6492 (pE194^{ts})	EcoRI PstI	pMW147.13	EcoRI PstI	Sp
pMW509.3	s6530 + s6531	-	pMW250.1	AgeI BglII	Sp
pMW510.3	s6516/s6527 (Bs3NA)	EcoRI NdeI	pMW504.7	EcoRI NdeI	Ap, Km
pMW513.3	pKAM20	EcoRI NotI	pMW510.3	EcoRI NotI	Ap, Em
pMW514.1	s6528 + s6529	-	pMW509.3	BglII AflII	Sp
pMW520.1	pMW514.1	AflII NcoI	pSUN291	AflII NcoI	Sp
pMW521.1	pMW506.1	EcoRI HaeII	pMW104.2	EcoRI HaeII	Sp
pMW523.1	s6621/s6622 (Bs3NA)	BamHI	pHM31	BamHI AP	Ap
pMW524.2	-	-	pMW520.1	XhoI NcoI Klenow dNTPs	Sp
pMW528.2	s6660 + s6661	-	pMW524.2	AgeI HindIII	Sp
pMW570.1	s6772/s6773 (pMW528.2), s6774/s6775 (pSUN291)	AgeI XhoI XhoI NdeI	pMW528.2	AgeI NdeI BglII	Sp
pMW574.1	s6105/s6776-s6777/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW376.8	AgeI MunI	Ap
pMW589.1	s6780/s6781 (pHM95)	BsrGI BamHI	pMW168.1	BsrGI BamHI AvaII	Sp
pMW601.6	pMW589.1	AgeI XmaI	pMW523.1	XmaI AP	Ap
pMW639.1	s6812 + s6813	-	pMW570.1	BglII HindIII	Sp
pMW661.1	pMW376.8	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW662.6	pMW394.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW663.1	pMW401.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW664.1	pMW402.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW665.1	pMW403.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW666.1	pMW404.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW667.3	pMW407.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW668.3	pMW408.3	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW669.1	pMW420.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW670.1	pMW436.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW671.2	pMW467.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp

Fortsetzung Tabelle 2-3.

Name	Insert		Vektor		Resistenz
pMW672.5	pMW574.1	BamHI XmnI	pSUN290	BamHI AP	Sp
pMW677.6	s6934/s6935 (Bs3NA)	BamHI BsrGI	pMW168.1	BamHI BsrGI	Sp
pMW678.6	pSUN290	BamHI	pMW523.1	BglII AP	Ap
pMW687.1	pSUN290	Acc65I BglII	pMW677.6	Acc65I BglII	Sp
pMW690.1	s6961 + s6962	-	pMW639.1	AgeI HindIII	Sp
pMW692.1	s6963 + s6964	-	pMW690.1	HindIII BglII	Sp
pMW711.2	s7030 + s7031	-	pMW692.1	BglII XhoI	Sp
pMW712.2	s6984/s6985 (pSUN290)	EcoRV KasI	pSUN290	EcoRV KasI	Sp
pMW718.1	-	-	pMW687.1	PmeI	Sp
pMW720.1	s7019 + s7020	-	pMW692.1	AgeI BglII	Sp
pMW722.4	s7056/s7057-s7058/s7059 (pMW692.1-pSUN290)	AgeI NdeI	pMW692.1	AgeI NdeI	Sp
pMW725.1	pSUN383.1	SmaI AgeI	pMW687.1	SmaI AgeI	Sp
pMW735.3	pSUN390.1	AgeI EcoRV	pMW725.1	AgeI SmaI	Sp
pMW745.5	s7243/s7244 (Bs3NA) + s7245/s7246 (Bs3NA)	BamHI SacI	pMW521.1	BamHI AP	Sp
pMW748.1	s7289/s7290 (Bs3NA) + s7291/s7292 (Bs3NA)	BamHI NcoI	pMW521.1	BamHI AP	Sp
pMW760.3	pSUN311.1	BglII AgeI	pMW687.1	BglII AgeI	Sp
pMW791.1	s7366/s7434 (Bs3NA)	PmeI BglI	pMW483.1	PmeI BglI	Sp
pMW804.3	s7357/s7371 (pMW687.1)	PacI BclI	pMW687.1	PacI BamHI AP	Sp
pMW812.1	s6105/s7492-s7493/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW661.1	AgeI MunI AP	Sp
pMW828.2	s7600/s7517 (Bs3NA)	NotI BamHI	pMW513.3	NotI BamHI AP	Ap, Em
pMW830.6	s7599/s7515 (Bs3NA)	EcoRI KasI	pMW828.2	EcoRI KasI	Ap, Sp, Em
pMW831.1	pMW93.1	BamHI XhoI	pMW830.6	BamHI SalI	Ap, Sp, Em
pMW833.1	s7646/s7647-s7648/s7649 (pMW431.10-pMW258.1)	AgeI BamHI	pMW258.1	AgeI BamHI AP	Sp

Fortsetzung Tabelle 2-3.

Name	Insert		Vektor		Resistenz
pMW847.1	s6105/s7664-s7665/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW376.8	AgeI MunI	Ap
pMW848.2	s6165/s7662-s7663/s6168 (pMW376.8)	BglII MunI	pMW376.8	BglII MunI	Ap
pMW850.2	s7654/s7655 (Bs3NA)	BamHI NdeI	pSUN390.1	BamHI NdeI	Ap
pMW851.2	s7656/s7657 (Bs3NA)	BamHI NdeI	pSUN390.1	BamHI NdeI	Ap
pMW852.1	s7658/s7659 (Bs3NA)	BamHI NdeI	pSUN390.1	BamHI NdeI	Ap
pMW854.1	pMW376.8	BamHI NdeI	pDG1730	BamHI AP	Sp, Ap
pMW871.1	-	-	pMW854.1	SphI	Sp, Ap
pMW872.1	pMW408.3	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW873.1	pMW401.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW875.4	pMW402.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW878.1	pMW574.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW879.5	pMW420.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW880.1	pMW394.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW881.2	pMW403.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW882.3	pMW404.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW883.2	pMW467.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW884.1	pMW847.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW885.2	pMW848.2	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW887.1	s7769/s7434 (Bs3NA)	PmeI BglI	pMW483.1	PmeI BglI	Sp
pMW889.1	-	-	pMW872.1	SphI	Sp, Ap
pMW890.2	-	-	pMW881.2	SphI	Sp, Ap
pMW891.2	-	-	pMW884.1	SphI	Sp, Ap
pMW893.12	pMW436.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Ap
pMW894.2	pMW812.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Ap
pMW895.11	pMW407.1	BglI BamHI	pDG1730	BamHI AP	Ap
pMW896.1	pMW848.2	BglII MunI	pMW847.1	BglII MunI	Ap
pMW897.1	-	-	pMW873.1	SphI	Sp
pMW898.1	-	-	pMW875.4	SphI	Sp
pMW899.1	-	-	pMW878.1	SphI	Sp
pMW900.1	-	-	pMW879.5	SphI	Sp
pMW901.1	-	-	pMW880.1	SphI	Sp
pMW902.1	-	-	pMW882.3	SphI	Sp
pMW903.1	-	-	pMW883.2	SphI	Sp

Fortsetzung Tabelle 2-3.

Name	Insert		Vektor		Resistenz
pMW904.1	-	-	pMW885.2	SphI	Sp
pMW906.1	-	-	pMW893.12	SphI	Sp
pMW907.9	pMW896.1	BamHI NdeI	pDG1730	BamHI AP	Sp
pMW910.1	-	-	pMW907.9	SphI	Sp
pMW912.1	-	-	pMW894.2	BglII PmeI Klenow dNTPs	Sp
pMW927.1	s6105/s7808-s7809/s6078 (Bs3NA)	MunI AgeI	pMW871.1	MunI AgeI AP	Sp
pMW933.1	s6105/s7827 (pMW871.1)	BglII AgeI	pMW871.1	BglII AgeI	Sp
pMW934.1	s6105/s7828 (pMW871.1)	BglII AgeI	pMW871.1	BglII AgeI	Sp
pMW965.3	s7864/s7865 (pACYC184)	PstI BglI	pMW483.1	PstI BglI	Sp
pMW967.1	s7366/s7434 (Bs3NA)	BglI PmeI	pMW965.3	BglI PmeI	Sp
pMW969.2	s7821/s7806-s7807/s7822 (pMW376.8)	BlpI	pMW871.1	BlpI AP	Sp
pMW971.1	s7963/s7964-s7965/s7966 (pMW173.1-Bs3NA)	KpnI EcoRI	pMW173.1	KpnI EcoRI	Sp
pMW972.2	pMW168.1	AgeI BamHI	pMW971.1	AgeI BamHI	Sp
pMW976.1	s6105/s7808-s7809/s6078 (Bs3NA)	AgeI MunI	pMW969.2	AgeI MunI AP	Sp
pMW977.1	s7963/s7964-s7965/s7966 (pMW173.1-Bs3NA)	KpnI EcoRI	pMW483.1	KpnI EcoRI	Sp
pMW978.1	pMW408.3	NgoMIV BstBI	pMW725.1	NgoMIV BstBI	Sp
pMW979.1	pMW401.1	NgoMIV BstBI	pMW725.1	NgoMIV BstBI	Sp
pMW980.2	pMW402.1	NgoMIV BstBI	pMW725.1	NgoMIV BstBI	Sp
pMW981.2	pMW407.1	NgoMIV BstBI	pMW725.1	NgoMIV BstBI	Sp
pMW982.6	pMW403.1	NgoMIV BstBI	pMW725.1	NgoMIV BstBI	Sp
pMW983.1	pMW404.1	NgoMIV BstBI	pMW725.1	NgoMIV BstBI	Sp
pMW987.6	s7660/s8043 (Bs3NA)	NdeI BamHI	pSUN390.1	NdeI BamHI	Ap
pMW996.2	pMW978.1	BamHI BstBI	pSUN246.1	BamHI BstBI	Ap
pMW997.1	pMW979.1	BamHI BstBI	pSUN246.1	BamHI BstBI	Ap
pMW998.1	pMW980.2	BamHI BstBI	pSUN246.1	BamHI BstBI	Ap
pMW999.1	pMW981.2	BamHI BstBI	pSUN246.1	BamHI BstBI	Ap

Fortsetzung Tabelle 2-3.

Name	Insert		Vektor		Resistenz
pMW1000.1	pMW982.6	BamHI BstBI	pSUN246.1	BamHI BstBI	Ap
pMW1001.4	pMW983.1	BamHI BstBI	pSUN246.1	BamHI BstBI	Ap
pMW1007.1	pMW969.2	BlpI	pMW661.1	BlpI	Sp
pMW1012.2	pMW927.1	BlpI	pMW661.1	BlpI	Sp
pMW1020.1	pMW891.2	AgeI MunI	pMW661.1	AgeI MunI	Sp
pMW1021.5	pMW904.1	AflII MunI	pMW661.1	AflII MunI	Sp
pMW1022.1	pMW910.1	AflII AgeI	pMW661.1	AflII MunI	Sp
pMW1034.7	s8366/s8367-s8368/s7659 (pMW852.1)	EcoRI BamHI	pSUN390.1	EcoRI BamHI	Sp
pMW1037.2	s8454/s8455 (Bs3NA)	NdeI BamHI	pSUN390.1	NdeI BamHI	Ap
pMW1043.1	pMW976.1	XmaI BlpI	pMW661.1	AgeI BlpI	Sp

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) bzw. Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) erworben.

2.2.2 Enzyme

Tabelle 2-4: Enzyme mit Hersteller und Verwendungszweck.

Enzym	Hersteller	Zweck
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Roche Applied Science, Thermo Scientific	Klonierung; Plasmid-Kontrolle
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Roche Applied Science	Verknüpfung kompatibler DNA-Enden
Klenow Enzym	Roche Applied Science	Klonierung; mit dNTPs Auffüllreaktion in 5′-3′-Richtung
Alkalische Phosphatase	Roche Applied Science	Abspaltung freier Phosphatgruppen am 5′-Ende der DNA
DNase I	New England Biolabs	DNase I Footprinting Experimente
High-Fidelity PCR Enzyme Mix	Thermo Scientific	PCR
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Scientific	Kolonie-PCR

2.2.3 Kits

Tabelle 2-5: Kits mit Hersteller und Verwendungszweck.

Name	Hersteller	Zweck
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Produkten
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN	Plasmidisolierung
DNeasy® Blood & Tissue Kit	QIAGEN	Isolierung chromosomaler DNA
ALFexpress AutoRead™ Sequencing Kit	GE Healthcare	DNA Sequenzierung
Strep-tag® AP Detection Kit	IBA	Nachweis von *Strep*-tag-Proteinen über Western Blot
ACCU-CHEK® Aviva	Roche	schnelle Glucose-Messung (bis 6 g l^{-1})
Mquant™ Ammonium-Test	Merck	kolorimetrischer NH_4^+-Nachweis

2.2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 2–6) wurden von Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg) bezogen und mit einer Konzentration von 100 µM eingesetzt. Cy5-markierte Oligonukleotide wurden lichtgeschützt gelagert, um ein Photobleaching des Fluorophors zu verhindern.

Tabelle 2-6: Verwendete Oligonukleotide. Abk.: FP, *forward* Primer; RP, *reverse* Primer; o, Operator; p, Promotor; bzgl. a, b, c, d (s. Kapitel 2.4.4); (*) s. Wenzel, 2009; (**) s. Sun, 2009.

Name	Sequenz (5′→3′ Richtung)	Verwendungszweck
s5019*	TTAAGCTCTTAAGGAGGATTTTAGAATGGCTAAAGAAAAATTCG	*tufA* Region
s5020*	TTAAGGAATTTTTCTTTAGCCATTCTAAAATCCTCCTTAAGAGG	*tufA* Region (komplementär)
s5097**	Cy5-CACTGTACCCTATCTGCGAAA	RP *manRo/p*
s5131*	AGTACTGTCGACTTTTTCC	FP *repA* (pBS72)
s5133*	AAAAAAGAATTCAGAATTAAGAAAGACATGGG	RP *repA* (pBS72)
s5139*	AAAAAATGATCATTACTTGTACAGCTCGTC	FP P*manP-eGFP*
s5155**	CTCTATTTCACAGACGAAAC	*manR* Sequenzierung
s5156*	AAAAAATGATCACCGGTCGATTGCCACATTAAAGG	RP P*manP-eGFP*
s5234*	AAAAAACCGCTCGTCTTCCTAAGCATCCT	FP *rep* (pUB110)
s5235*	AAAAAAGAATTCGAGATCAGGGAATGAGTTT	RP *rep* (pUB110)
s5236*	TTAAGAATTAAAGGAGGAATTCAAAATGGCAGACAATAACAAAG	*gsiB* Region
s5237*	GATCCTTTGTTATTGTCTGCCATTTTGAATTCCTCCTTTAATTC	*gsiB* Region (komplementär)
s5243*	GATCTCACAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTC	*aprE leader*

Fortsetzung Tabelle 2-6.

Name	Sequenz (5′→3′ Richtung)	Verwendungszweck
s5244*	TTAAGAGAGTAGACTTACTTAAAAGACTATTCTGTGA	*aprE leader* (komplementär)
s5245*	TTAAGTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAGAAGCAAAAAATTGG	*aprE* Region
s5246*	GATCCCAATTTTTTGCTTCTCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAC	*aprE* Region (komplementär)
s5426*	AAAAATAACGGTTCAGTCGTCAAGAAAATCCCCCGCTTTATTCG	RP TTG-*manA*
s5432*	AAAAAACTCGAGCATGTGAGCAAAAGGCCAG	FP pUC18 Replicon
s5433*	AAAAAAGTTTAAACCCGTAGAAAAGATCAAAGG	RP pUC18 Replicon
s5434*	CAGAGGCCTTACAATATG	RP *repA*
s5437*	AAAAAAGGATCCGATCTGGAAAAACAAATCG	FP ORF-2 (pBS72)
s5617*	GGAGGGGAGAAAACACCTA	FP *manP*
s5620*	AAAAAAGATATCATTTCTCAAGCCCTGCCATG	RP *manA*
s5624*	GTCGCAATCATAGGGAACAT	RP *ptsHI*
s5683*	CGAATAAAGCGGGGGATTTTCTTGACGACTGAACCGTTATTTTT	FP TTG-*manA*
s5867	AAAAAAGGATCCTAAGGGTGTTAGTACGCCGT	FP *ptsHI*
s5868	AAAAAAGGCGCCGCCCGTCGGTTTAAAAAA	FP *yjdA-yjdB*
s5869	AAAAAACTTAAGCTCTCTCAGCAATTTTCCAT	RP *yjdA-yjdB*
s5996	AAAAAACATATGCTATCAAGTGCCCGCG	FP *gmuREFG* upstream
s5997	AAAAAACTTAAGCTATGCTCAGCAACCTCTT	RP *gmuREFG* upstream
s5998	AAAAAAAGATCTATTACTTGTAACTCTCC	FP *gmuREFG* downstream
s5999	AAAAAAGAATTCTTTCACGCCTTCCCATG	RP *gmuREFG* downstream
s6075	GATCTCAATACTGTGCTACAA	c *manR*-H334D
s6076	CGATCGCTGCCTGAAAATCCAATGTCAAATATGCTGCC	b *manR*-H393D
s6077	GATTTTCAGGCAGCGATCG	c *manR*-H393D
s6078	TGGTGGATATGACAAGATC	d *manR* universal
s6105	GGACATTTGCTTGTTTACAGCGGC	a *manR* universal
s6106	GCCGTTGTAGCACAGTATTGAGATCAATGTTCAAACCATTGATCAAATCC	b *manR*-H334D
s6154	GTCGGGGCTGGCTTAAC	a *manR*-H222A
s6155	GGCGGACCATTAACAATGTTGCCAGCAACAAACTTTCAAACG	b *manR*-H222A
s6156	GCAACATTGTTAATGGTCCGCC	c *manR*-H222A
s6157	CACGGCTTCTTCTTCAGG	d *manR*-H222A
s6158	GAACCTTACCGCCCAATATTGCTAATGTTAAGTACACGGCTTC	b *manR*-H281A
s6159	GCAATATTGGGCGGTAAGGTTC	c *manR*-H281A
s6160	CCGTTGTAGCACAGTATTGAGTGCAATGTTCAAACCATTGATCAAATC	b *manR*-H334A
s6161	GCACTCAATACTGTGCTACAACG	c *manR*-H334A
s6163	GCATTTCAGGCAGCGATCGAAC	c *manR*-H393A
s6164	CATCCCAATCCCCATGTGTGCGACGATAACCGCCTTTTTAT	b *manR*-C415A
s6165	GCACACATGGGGATTGGGATG	c *manR*-C415A
s6166	GTTTAATAAATTTAGCGTTTGCTGCAGGAATGGCAATG	b *manR*-H570A
s6167	GCAGCAAACGCTAAATTTATTAAAC	c *manR*-H570A
s6168	CACTCCTTAAGTCTAGAAAG	d *manR*-H570A

Fortsetzung Tabelle 2-6.

Name	Sequenz (5′→3′ Richtung)	Verwendungszweck
s6171	GTTCGATCGCTGCCTGAAATGCCAATGTCAAATATGCTGCCT	b *manR*-H393A
s6447	AAAAAACTCGAGTCTGGCTCTTGATAATGTACACTATACGAAGTT ATGGCCAGTTTGTTGAAGATTAG	FP *neo*
s6448	AAAAAACTCGAGTCTGGCTCTTGATAATGTACACTATACGAAGTT ATCGACCGGTGATCCAAAAAAC	RP *neo*
s6491	AAAAAAGAATTCGCATCACACGCAAAAAGG	FP pE194^{ts} *ori*
s6492	AAAAAACTGCAGACACCTAAATTCAAAATCTATC	RP pE194^{ts} *ori*
s6516	AAAAAACATATGCATGCCGAGCATCGCACAG	FP *ntdABC-glcP* upstream
s6518	AAAAAAGCGGCCGCAAAGCGAAAAACACGCACC	FP *ntdABC-glcP* downstream
s6519	AAAAAAGGATCCTGTCATTGAGGCAGGAAGC	RP *ntdABC-glcP* downstream
s6527	AAAAAAGAATTCTTTCATTTCACCCTCTGGC	RP *ntdABC-glcP* upstream
s6528	GATCTTTTTGTTTTATAATGTTATAGGATATC	Mutation - P_{manR}
s6529	TTAAGATATCCTATAACATTATAAAACAAAAA	Mutation - P_{manR}
s6530	CCGGTTCGCTTTTTTCCGGAAGCTTCGGTAAAAAACGAAACTTTTGTCTA	Mutation - P_{manR}
s6531	GATCTAGACAAAAGTTTCGTTTTTTACCGAAGCTTCCGGAAAAAAGCGAA	Mutation - P_{manR}
s6621	AAAAAAGGATCCAGATCTGCATGCTGGATGATGTGCTTGACGT	FP *yvcA* (pHM31)
s6622	ACTCTCTCGTTTTCTCGTCC	RP *yvcA* (pHM31)
s6660	CCGGTTAAAAATCGCTTTTTTCCGGA	Mutation - P_{manR}
s6661	AGCTTCCGGAAAAAAGCGATTTTTAA	Mutation - P_{manR}
s6772	TCTCGTTTTTTGGATCACCG	Mutation - P_{manR}
s6773	AAAAAACTCGAGATATCCTATAACATTATAAAAC	Mutation - P_{manR}
s6774	AAAAAACTCGAGTATACTTATACTATCAATTTGC	Mutation - P_{manR}
s6775	CAGTCACGACGTTGTAAAAC	Mutation - P_{manR}
s6776	GTTCGATCGCTGCCTGAAAATCCAATGTCAAATATGCTGCCT	b *manR*-H393D
s6777	GATTTTCAGGCAGCGATCGAAC	c *manR*-H393D
s6780	AAAAAAGGATCCATGAGTGAAGTAAACCTAAAAG	FP *repA* (pBS72)
s6781	AAAAAATGTACATTATTGCACTTTTCTTAGTTCG	RP *repA* (pBS72)
s6812	AGCTTCGGTAAAAAACGAACTTTTGTCTA	Mutation - P_{manR}
s6813	GATCTAGACAAAAGTTCGTTTTTTACCGA	Mutation - P_{manR}
s6934	AAAAAAGGATCCGAATACATAAATACAAGACAAAAAG	FP *manR*
s6935	AAAAAATGTACATTAATAATCCAAATGAGATAAAAATG	RP *manR*
s6961	CCGGTTAAAAATCGCTTTTTTACCGGA	Mutation - P_{manR}
s6962	AGCTTCCGGTAAAAAAGCGATTTTTAA	Mutation - P_{manR}
s6963	AGCTTCGGTAAAAAAAGAAATTTTGTCTA	Mutation - P_{manR}
s6964	GATCTAGACAAAATTTCTTTTTTTACCGA	Mutation - P_{manR}
s6984	AAAAAAGGCGCCAAAATGCCTTTATTACCGGAAC	Mutation - P_{manP}
s6985	GCACGGCGTTAAAGTTGTTC	Mutation - P_{manP}
s7019	CCGGTGAAAAATGCCTTTATTACCGGAACCTATGGTAAAAAAAGCGATT TTAATGA	*manPo-manRp*-Fusion
s7020	GATCTCATTAAAATCGCTTTTTTTACCATAGGTTCCGGTAATAAAGGCA TTTTTCA	*manPo-manRp*-Fusion

Fortsetzung Tabelle 2-6.

Name	Sequenz (5′→3′ Richtung)	Verwendungszweck
s7030	GATCTTTTTGTTATATAATGTTATAGGATATC	Mutation - P_{manR}
s7031	TCGAGATATCCTATAACATTATATAACAAAAA	Mutation - P_{manR}
s7056	TCTCTTGCCAGTCACGTTAC	*manPo-manRp*-Fusion
s7057	TAGAAAGTGTGAATAATAAGATCTCTATAACATTATAAAACAAAAAGAT	*manPo-manRp*-Fusion
s7058	ATCTTTTTGTTTTATAATGTTATAGAGATCTTATTATTCACACTTTCTA	*manPo-manRp*-Fusion
s7059	ACCAGGCAAAGCGCCATTC	*manPo-manRp*-Fusion
s7135	Cy5-GTTCTAAATAGGTGAAGAATTG	FP *manRo/p*
s7136	CCGTTTACATTATAAAACAAAATC	RF *manRo/p*
s7137	GTTCTAAATAGGTGAAGAATTG	FP *manRo/p*
s7232	Cy5-AGCTGACGAAAGAAACCAATG	FP *manPo/p*
s7233	GTCTCAACTGTATACCGAAATC	RP *manPo/p*
s7234	AGCTGACGAAAGAAACCAATG	FP *manPo/p*
s7243	TATATAGGATCCATATGTGACGTTTCCGCTTAC	FP *tnrA* upstream
s7244	TTTTAAGAGCTCCATTTTTCCACCCCTGGATG	RP *tnrA* upstream
s7245	AAAAAAGAGCTCTAAATAATAAAAGTCCGGCTCG	FP *tnrA* downstream
s7246	TTCAGCGGGACGCATGATG	RP *tnrA* downstream
s7289	AAAAAAGGATCCCGAAAATGACCATCGAGACAG	FP *alrA* upstream
s7290	AAAAAACCATGGCATTACGACACTTCCTAGCTTT	RP a*lrA* upstream
s7291	TTAAATCCATGGTAACTTACCTAAATGGAGAATTC	FP *alrA* downstream
s7292	AAAAAAGGATCCGCTGATAGGATTCTTGCTCG	RP *alrA* downstream
s7357	GTACCTATTTTATATCCATAGTTG	FP His_6-*manR*
s7366	AAAAAAGTTTAAACTCGGCTACACCATCGGCG	FP *alrA*
s7371	AAAATGATCAATGATGATGATGATGATGTTTGTTATTGTCTGCCATTTTG	RP His_6-*manR*
s7434	AAAAAAGCCATTCAGGCAATTCTCCATTTAGGTAAGTTAAT	RP *alrA*
s7492	CCGTTGTAGCACAGTATTGAGATCAATGTTCAAACCATTGATCAAATC	b *manR*-H334D
s7493	GATCTCAATACTGTGCTACAACG	c *manR*-H334D
s7515	AAAAAAGAATTCCATGATAAATAATCCTCCTAAAC	RP *codY* upstream
s7517	AAAAAAGGATCCGCTTCCGCTCATTTGAG	RP *codY* downstream
s7599	AAAAAAGGCGCCGTTTTTTGGAGGCAGCCAGC	FP *codY* upstream
s7600	AAAAAAGCGGCCGCTCTCATTAATCACAAAAAGAACC	FP *codY* downstream
s7646	AAAAAAACCGGTCGCTCGTTTTTATGCTGGCT	*manPo-gutBp*
s7647	CCATTTTATCTGCTTTTTAACACGTTAAAATCGCTTTTTTTACCATAG	*manPo-gutBp*
s7648	CTATGGTAAAAAAAGCGATTTTAACGTGTTAAAAAGCAGATAAAATGG	*manPo-gutBp*
s7649	TGAACTTCAGGGTCAGCTTG	*manPo-gutBp*
s7654	AAAAAACATATGGCACAAAAAACATTTAAAGTA	FP *ptsH*
s7655	AAAAAAGGATCCCTCGCCGAGTCCTTCGCT	RP *ptsH*
s7656	AAAAAACATATGCAAGAATTAAAAGGGATTGG	FP *ptsI*
s7657	AAAAAAGGATCCCTTGAATGTTTCTTTTACGAACG	RP *ptsI*
s7658	AAAAAACATATGAAACTGTTAGCGATTACATC	FP *manP*-EIIB

Fortsetzung Tabelle 2-6.

Name	Sequenz (5′→3′ Richtung)	Verwendungszweck
s7659	TTTATTGGATCCTTGTTTCTTCTCCTGATGATTAC	RP *manP*-EIIB
s7660	TTTTTTCATATGTTTTTTATTGCTGTGATTGC	FP *manP*-EIIA
s7662	GTTTAATAAATTTAGCGTTTGCATCAGGAATGGCAATG	b *manR*-H570D
s7663	GATGCAAACGCTAAATTTATTAAAC	c *manR*-H570D
s7664	CATCCCAATCCCCATGTGATCGACGATAACCGCCTTTTTAT	b *manR*-C415D
s7665	GATCACATGGGGATTGGGATG	c *manR*-C415D
s7769	AAAAAACATATGTCGGAATTAAAAAAGCTGAC	RP *manP*-EIIA
s7806	GGCGGACCATTAACAATGTATCCAGCAACAAACTTTCAAACG	b *manR*-H222D
s7807	GATACATTGTTAATGGTCCGCC	c *manR*-H222D
s7808	GAACCTTACCGCCCAATATATCTAATGTTAAGTACACGGCTTC	b *manR*-H281D
s7809	GATATATTGGGCGGTAAGGTTC	c *manR*-H281D
s7821	TCTCAATGAGCATTCTCATGC	a *manR*-H222D
s7822	CAATGTCAAATATGCTGCCTC	d *manR*-H222D
s7827	AAAAAAAGATCTTTAGTTCGATCGCTGCCTGAAAAT	RP *manR*-ΔEIIBA
s7828	AAAAAAAGATCTTTACAGCTGACGTATAAACGCACT	RP *manR*-ΔEIIA
s7864	AAAAAAGCCTGAATGGCGCGCTAGCGGAGTGTATAC	FP pACYC184 *ori*
s7865	AAAAAACTGCAGACAACTTATATCGTATGGGGC	RP pACYC184 *ori*
s7963	AATTATTATTCAGCAAGAAATGGT	*aad9-alrA*-Fusion
s7964	CTTCCTAGCTTTTATAATTTTTTTAATCTGTTATTTAAA	*aad9-alrA*-Fusion
s7965	TAAAAAAATTATAAAAGCTAGGAAGTGTCGTAATG	*aad9-alrA*-Fusion
s7966	CTCTTTTATCCATCCAGTGATA	*aad9-alrA*-Fusion
s8001	Cy5-CAGTTTCATAGGAAACCTCCT	RP *manPo/p*
s8002	CAGTTTCATAGGAAACCTCCT	RP *manPo/p*
s8043	AAAAAAGGATCCTTCGATTTCTTCTAGCAGCTTG	RP *manP*-EIIA
s8091	CACTGTACCCTATCTGCGAAA	RP *manRo/p*
s8366	CCCCACTTAATCCACTGAAG	*manP*-C9A
s8367	CCATTCGGTGCAGATGTAATCGCTAACAGTTTCAT	*manP*-C9A
s8368	GCGATTACATCTGCACCGAATGGAATCGCCCATAC	*manP*-C9A
s8454	ATTTAACATATGGCTTTATTACAAAAAACAAGAATTA	FP *codY*
s8455	AAAAAAGGATCCATGAGATTTTAGATTTTCTAATTCAATTA	RP *codY*
s8822	Cy5-CAGACTCAATCCATATACGAAC	FP *ilvBp*
s8824	CCAGCTGTTCAAGAAGGTCG	RP *ilvBp*

2.2.5 Medien

Tabelle 2-7: Verwendete Medien für Kultivierung, Stammhaltung und Transformation. Für die Herstellung von LB-Agar-Nährböden wurde 15 g l^{-1} Euroagar (Becton Dickinson GmbH) zugegeben. Die Medien wurden 30 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert.

Medium	Komponenten	Zusammensetzung	
LB-Medium (pH 7,2)	Trypton	10,0	g
(Bertani, 1951)	Hefeextrakt	5,0	g
	NaCl	5,0	g
	VE H_2O	ad 1,0	l
TY-Medium (pH 7,2)	Trypton	5,0	g
	Hefeextrakt	2,5	g
	VE H_2O	ad 0,5	l
Glycerinkulturmedium	Glycerin (86 % v/v)*	57,5	ml
	TY-Medium*	42,5	ml
Spizizens Minimalmedium (SMM)	$(NH_4)_2SO_4$	2,0	g
(Spizizen, 1958)	KH_2PO_4	6,0	g
	K_2HPO_4	14,0	g
	Na_3Citrat	1,0	g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,2	g
	D-Glucose*	5,0	g
	VE H_2O	ad 1,0	l
Transformationsmedien			
Transformation and Storage	LB-Medium (pH 6,5)**	82,5	ml
Solution (TSS-Medium)	PEG 6000	10,0	g
(Chung *et al.*, 1989)	DMSO	5,0	ml
	$MgCl_2$ (2 M)	2,5	ml
Medium I	SMM	9,50	ml
	Casamino Acids (1 % w/v)*	0,20	ml
	$MgSO_4$ (1 M)*	0,05	ml
Medium II	SMM	8,00	ml
	Casamino Acids (1 % w/v)*	0,10	ml
	$MgSO_4$ (1 M)*	0,05	ml

* separat autoklaviert

** Der pH-Wert wurde mit 2 M NaOH bzw. 1 M HCl-Lösung eingestellt.

Tabelle 2-8: Verwendete Fermentationsmedien (nach Wilms *et al.*, 2001).

Medium	Komponenten	Zusammensetzung
Vorkulturmedium I (VK1)	SMM	9,50 ml
	Casamino Acids (1 % w/v)*	0,20 ml
Vorkulturmedium II (VK2) / Batch-Medium	$(NH_4)_2H$-Citrat	1,00 g l^{-1}
	Na_2SO_4	2,00 g l^{-1}
	$(NH_4)_2SO_4$	2,68 g l^{-1}
	NH_4Cl	0,50 g l^{-1}
	K_2HPO_4	14,60 g l^{-1}
	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	4,00 g l^{-1}
	D-Glucose*	5,00 g l^{-1} / 25,00 g l^{-1}
	$MgSO_4$ (1 M)*	2,00 ml l^{-1}
	Casamino Acids (10 % w/v)*	5,00 ml l^{-1}
	SEL (s. u.)*	3,00 ml l^{-1}
Feed-Medium I	Glucose × H_2O*	654,76 g l^{-1}
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$*	23,50 g l^{-1}
	SEL (s.u.)*	120,00 ml l^{-1}
Feed-Medium II	$(NH_4)_2HPO_4$ (pH 7,0)**	396,00 g l^{-1}
Spurenelementlösung (SEL)	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0,50 g l^{-1}
	$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	16,70 g l^{-1}
	Na_2-EDTA	20,10 g l^{-1}
	$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,18 g l^{-1}
	$MnSO_4 \times H_2O$	0,10 g l^{-1}
	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,16 g l^{-1}
	$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,18 g l^{-1}

* separat autoklaviert

** pH-Wert mit 85 %iger (v/v) ortho-Phosphorsäure eingestellt

2.2.6 Antibiotika und andere Medienzusätze

Tabelle 2-9: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg ml^{-1} in 50 % Ethanol	100 µg ml^{-1}
Chloramphenicol	25 mg ml^{-1} in Ethanol	5 µg ml^{-1}
Kanamycin	50 mg ml^{-1} in 0,1 M NaOH	10 µg ml^{-1}
Spectinomycin	100 mg ml^{-1} in VE H_2O	100 µg ml^{-1}
Erythromycin	10 mg ml^{-1} in 50 % Ethanol	5 µg ml^{-1}

Tabelle 2-10: Verwendete Medienzusätze.

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
D-Alanin	10 g l^{-1} in VE H_2O	100 µg ml^{-1}
Casamino Acids (CA / CAVF)	1-10 % (w/v) in VE H_2O	0,02 % (w/v)
Caseine Enz. Hydr. (CEH)	2 % (w/v) in VE H_2O	0,02 % (w/v)
Casitone	2 % (w/v) in VE H_2O	0,02 % (w/v)
D-Glucitol	20 % (w/v) in VE H_2O	0,2 % (w/v)
D-Glucose	20 % (w/v) in VE H_2O	0,5 % (w/v)
Hefeextrakt	10 % (w/v) in VE H_2O	0,5 % (w/v)
IPTG	100 mM in 50 % Ethanol	250 µM
D-Mannose	20 % (w/v) in VE H_2O	0,2 % (w/v)
o-NPG	20 mM in Z-Puffer (Tab. 2-14)	3,5 mM
L-Rhamnose	20 % (w/v) in VE H_2O	0,2 % (w/v)
Trypton	20 % (w/v) in VE H_2O	0,02 % (w/v)
X-Gal	156 mM in Dimethylformamid	195 µM

2.2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 2-11: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.

Puffer/Lösung	Komponenten	Zusammensetzung	
Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Brillant-Blau R-250	2,0	g
	Coomassie-Brillant-Blau G-250	0,5	g
	Ethanol	425	ml
	Methanol	50	ml
	Eisessig	100	ml
	VE H_2O	ad 1,0	l
Entfärbelösung	Ethanol	450	ml
	Eisessig	100	ml
	VE H_2O	450	ml
5× SDS-Auftragspuffer	TRIS/HCl (2 M, pH 6,8)	6,25	ml
	EDTA	0,146	g
	SDS (40 % w/v)	6,25	ml
	β-Mercaptoethanol (reinst)	2,50	ml
	Glycerin (86 % v/v)	29,00	ml
	Bromphenolblau	0,05	g
	VE H_2O	ad 50	ml
10× SDS-Laufpuffer	TRIS	30	g
	Glycin	144	g
	SDS (20 % w/v)	50	ml
	VE H_2O	ad 1,0	l

Tabelle 2-12: Puffer und Lösungen für Biofeedback-Plasmidisolierungen.

Puffer/Lösung	Komponenten	Zusammensetzung	
Resuspendierungspuffer	D-Glucose	9,9	g
	TRIS/HCl (1 M, pH 8,0)	25,0	ml
	EDTA	3,72	g
	VE H_2O	ad 1,0	l
Lysepuffer	NaOH (2 M)	0,84	ml
	SDS (10 % w/v)	0,84	ml
	VE H_2O	6,72	ml
Neutralisierungslösung	NH_4-Acetat	578,1	g l^{-1}

Tabelle 2-13: Puffer für die Affinitätschromatographie.

Puffer	Komponenten	Endkonzentration	
Aufreinigung von Proteinen mit His_6-Affinitätstag			
Ni-NTA-Lysepuffer	NaH_2PO_4	50	mM
	NaCl	300	mM
	Imidazol	10	mM
Ni-NTA-Waschpuffer	NaH_2PO_4	50	mM
	NaCl	300	mM
	Imidazol	50	mM
Ni-NTA-Elutionspuffer	NaH_2PO_4	50	mM
	NaCl	300	mM
	Imidazol	200	mM
Aufreinigung von Proteinen mit *Strep*-Affinitätstag			
Puffer W	TRIS / HCl (1 M, pH 8,0)	100	mM
	NaCl	150	mM
	EDTA	1	mM
Puffer E	TRIS / HCl (1 M, pH 8,0)	100	mM
	NaCl	150	mM
	EDTA	1	mM
	Desthiobiotin	2,5	mM
Puffer R	TRIS / HCl (1 M, pH 8,0)	100	mM
	NaCl	150	mM
	EDTA	1	mM
	HABA	1	mM

Tabelle 2-14: Sonstige Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Bestandteile	Zusammensetzung	
50× TAE	TRIS	242,0	g
	Eisessig	57,1	ml
	EDTA	18,6	g
	VE H_2O	ad 1,0	l
50× TBE	TRIS	108	g
	Borsäure	55	g
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)*	40	ml
	VE H_2O	ad 1,0	l
Lysepuffer für Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis*	TRIS	3	g l^{-1}
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)*	0,05	ml l^{-1}
	Sucrose	100	g l^{-1}
	Lysozym	20,0	mg ml^{-1}
10× DNA-Auftragspuffer für Agarosegelelektrophorese	Xylencyanol	0,5	g
	Bromphenolblau	0,5	g
	Glycerin (86 % v/v)	116,3	ml
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)*	ad 200,0	ml
5× Gelmobilityshift-Assay-Puffer	TRIS/HCl (1 M, pH 7,5)	50	mM
	KCl	250	mM
	BSA	250	µg ml^{-1}
	Fischsperma DNA	250	µg ml^{-1}
	Glycerin	25	% (v/v)
	Dithiothreitol	10	mM
Farbmarker für native PAGE	TRIS/HCl (1 M, pH 6,8)	250	mM
	Glycerin	50	%
	Bromphenolblau	0,005	%
DNaseI Stopp-Puffer	EDTA (0,5 M, pH 8,0)*	50	mM
	Kälber-Thymus DNA	15	µg ml^{-1}
Z-Puffer	Na_2HPO_4 (1 M)	60	ml
	NaH_2PO_4 (1 M)	40	ml
	KCl (2 M)	5	ml
	$MgSO_4$ (1 M)	1	ml
	β-Mercaptoethanol	2,7	ml
	VE H_2O	ad 1,0	l

*Der pH-Wert wurde mit 2 M NaOH- bzw. 1 M HCl-Lösung eingestellt.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierungstemperatur für *E. coli* und *B. subtilis* Stämme betrug 37 °C, wenn nicht anders vermerkt. Benötigte Stämme wurden auf LB-Agarböden unter Selektionsdruck vereinzelt und bei 8 °C für maximal vier Wochen gelagert. Für die Herstellung von Übernachtkulturen (ÜK) wurden 5 ml Kulturmedium mit Einzelkolonien angeimpft und für ca. 16 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurden die ÜK abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellpellets in 3 ml Glycerinkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei 2 ml-Gefrierröhrchen verteilt und diese bei -20 bzw. -70 °C gelagert.

2.3.2 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte im GENESYS 10 Vis Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Ulm) bei 600 nm. Die Eichung erfolgte gegen Luft. Die OD_{600} ergab sich aus der Differenz der Probenmesswerte und dem Wert für das verwendete Kulturmedium. Um im linearen Messbereich des Photometers zu bleiben, wurden die Proben ab einer $OD_{600} \approx 0{,}5$ mit dem verwendeten Medium 1:10 verdünnt.

2.3.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der TSS-Hitzeschock-Methode (Chung *et al.*, 1989): Pro Transformationsansatz wurden 5 ml LB_0-Medium 1:100 mit ÜK von *E. coli* JM109 bzw. NM538 angeimpft und für 135 min bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} \approx 0{,}4$ inkubiert (Schüttler, 200 rpm). Die Kultur wurde daraufhin in vorgekühlte SS-34-Zentrifugationsröhrchen überführt und auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden pelletiert (Sorvall RC 5B Plus Kühlzentrifuge, SS-34-Festwinkelrotor, 4.500 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und pro Transformationsansatz mit 200 µl eisgekühltem TSS-Medium (*Transformation and Storage Solution*) resuspendiert. Je 200 µl der TSS-Zellsuspension wurden mit ca.

200 ng gereinigter Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden 200 µl kompetente Zellen ohne Zugabe von DNA der gleichen Transformationsprozedur unterzogen. Die Zellen wurden anschließend einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C im Wasserbad unterzogen, um in der Zellmembran kurzfristig Poren für die DNA-Aufnahme entstehen zu lassen. Die transformierten Zellen wurden danach sofort wieder auf Eis abgekühlt und in Reagenzgläser mit 2 ml LB_0-Medium überführt. Nach 45 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 5 min, 4.500 rpm, RT), der Überstand dekantiert, das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und alles auf LB-Agar-Nährboden mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Negativ-Kontrolle wurde ebenfalls auf diesem Medium ausplattiert. Wurde Plasmid-DNA für die Transformation eingesetzt, entfiel der letzte Zentrifugationsschritt, und es wurden 100 µl direkt ausplattiert.

2.3.4 Transformation von *B. subtilis*

Für die Herstellung natürlich kompetenter *B. subtilis* Zellen (nach Anagnostopoulos und Spizizen, 1961) wurden zunächst 5 ml Medium I mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach Überführung von 1 ml der ÜK ($OD_{600} \approx 2$) in 8 ml Medium II erfolgte eine Inkubation für 85 min bei 37 °C (Schüttler, 200 rpm). Von dieser Kultur, mit einem Optimum an kompetenten Zellen, wurde pro Ansatz 1 ml mit Plasmid-DNA versetzt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde für diese Zwecke i. d. R. aus *E. coli* NM538 isoliert. Dieser Stamm neigt zur Bildung von Plasmid-Multimeren, welche wiederum zu einer besseren Transformationsrate mit *B. subtilis* Zellen führen können. Die transformierten Zellen wurden anschließend pelletiert (Heraeus Megafuge, 5 min, 4.500 rpm, RT), der Überstand dekantiert und das Pellet im Resttropfen resuspendiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

2.3.5 Genexpression in *E. coli* JM109

Für die Expression plasmidcodierter Gene in *E. coli* JM109 wurden zunächst ÜK hergestellt und damit die Hauptkulturen auf eine $OD_{600} \approx 0{,}05$ angeimpft. Nach Inkubation für ca. 2 h bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} \approx 0{,}3$ - 0,4 erfolgte die Zugabe von 0,2% (w/v) L-Rhamnose (Induktor) und eine weitere Inkubation für 4 h bei 30 °C. Aliquots à 1×10^{10} Zellen (entsprechend einer $OD_{600} \approx 10$) wurden geerntet (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT), mit 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen, und die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.6 Genexpression in *B. subtilis*

Die Genexpression in *B. subtilis* 3NA erfolgte analog zu *E. coli* JM109, nur dass für die Induktion 0,2% (w/v) D-Mannose verwendet wurde. Die Genexpression in *B. subtilis* TQ356 verlief aufgrund der selbstinduzierenden Eigenschaften dieses Stamms folgendermaßen: Ausgehend von Einzelkolonien auf selektiven LB-Agarnährböden, die zusätzlich mit 1% (w/v) D-Glucose versetzt worden waren, wurden ÜK in Schüttelkolben mit Schikanen für ca. 16 h über Nacht bei 30 °C angezogen. Die Zellernte von ca. 10 OD_{600} Zellen erfolgte durch Zentrifugation (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT). Vor der Lagerung bei -20 °C wurden die Zellen mit 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen.

2.3.7 Plasmidstabilitätstest

Um die Stabilität von Plasmiden in den *B. subtilis* Stämmen TQ356, MWZ 14 und MWZ 15 zu bestimmen, wurde wie folgt vorgegangen: ÜK dieser Stämme mit den entsprechenden Vektoren wurden in LB-Medium mit Antibiotikum bei 37 °C angezogen (Schüttler, 200 rpm). Nach Bestimmung der OD_{600} wurde davon ein bestimmtes Volumen in frisches LB-Medium ohne Antibiotikum überführt, um etwa 50 Zellen pro ml zu erhalten. Diese Kultur wurde für etwa 24 h bei 37 °C inkubiert (Schüttler, 200 rpm). Dabei teilten sich die Zellen für etwa 25 Generationen. Dies wurde 3-mal wiederholt, bis etwa 100 Generationen gebildet worden waren. Nach jeweils 25 Generationen wurden die Kulturen so auf LB-Medium (mit D-Alanin) ausplattiert, dass etwa 200 - 300 Kolonien über Nacht bei 30 °C entstanden. Diese

wurden wiederum auf ihre Spectinomycin-Resistenz sowie auf ihre fluoreszierenden Eigenschaften (*eGFP* Expression) unter Anregung mit blauem Licht (400 bis 500 nm; Dark Reader DR89X Transilluminator; Clare Chemical Research, Dolores, Colorado, USA) gescreent.

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Plasmidisolierung

Für Klonierungen und Transformationen wurden Plasmide mit hohem Reinheitsgrad mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit" (nach Protokoll des Herstellers) aus 5 ml ÜK (i.d.R. *E. coli* JM109 bzw. NM538) isoliert. Für Plasmidisolierungen aus *B. subtilis* Stämmen wurden die Zellen zunächst im Puffer P1 des Kits mit 10 mg ml^{-1} Lysozym resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die Plasmide wurden bei 5 °C bzw. -20 °C gelagert.

Eine kostengünstigere Alternative ist die Biofeedback-Methode (Lee und Rasheed, 1990): *E. coli* Zellen aus 2 ml ÜK wurden pelletiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Der Zellaufschluss erfolgte mit 300 µl Lysepuffer. Die alkalische Lyse wurde nach 1–5 min Inkubation bei RT durch Zugabe von 400 µl Neutralisierungslösung gestoppt. Chromosomale DNA und denaturierte Proteine wurden pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13.200 rpm, 5 min, RT). Durch Überführung von 800 µl des Überstands in neue Reaktionsgefäße, die zuvor mit 700 µl Isopropanol befüllt wurden, wurde die Plasmid-DNA für 10 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.200 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Plasmid-Pellet mit 150 µl 100 % Ethanol gewaschen (13.200 rpm, 3 min, RT). Die pelletierte Plasmid-DNA wurde 5 min bei RT luftgetrocknet und anschließend in 100 µl VE H_2O resuspendiert. Jeweils 8 µl der auf diese Weise isolierten Plasmid-DNA wurden umgehend für Restriktionsanalysen verwendet.

2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Sollten die Fragmente für Klonierungen verwendet werden, wurde der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ für die Amplifikation verwendet. Dieser besteht aus *Taq* DNA-Polymerase und einer thermostabilen DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion (engl. *proof-reading*), die falsch eingebaute Nukleotide erkennt und über eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität wieder aus der DNA entfernt. Um Deletionen oder chromosomale Integrationen nachzuweisen, wurde auf die *proof reading*-Aktivität verzichtet und die „DreamTaq DNA-Polymerase“ verwendet. Die PCR-Ansätze mit jeweils 100 µl Reaktionsvolumen setzten sich wie in Tabelle 2–15 beschrieben zusammen.

Tabelle 2-15: Zusammensetzung eines 100 µl PCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen
Template-DNA (ca. 25 ng)	x µl
10× Puffer inkl. $MgCl_2$ (25 mM)	10 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
forward-Primer (100 µM)	1 µl
reverse-Primer (100 µM)	1 µl
DNA-Polymerase (5 U $µl^{-1}$)	1 µl
H_2O (Nuklease frei)	ad 100 µl

Für die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde der TPersonal Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) mit folgendem Temperaturprofil verwendet:

Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	92 °C	1 min	30x
Primer-Annealing	variabel	1 min	
Elongation	72 °C	variabel	
finale Elongation	72 °C	5-10 min	

Die Annealing-Temperatur wurde 5 Kelvin unterhalb der gemeinsamen Schmelztemperatur des Primerpaares gewählt. Die Elongationsdauer wurde in Abhängigkeit der Länge des Zielfragments mit 1 min kb^{-1} eingestellt.

Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mithilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits“ nach Anleitung des Herstellers.

2.4.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle und kostensparende Methode, um chromosomale Modifikationen nachzuweisen, ohne die chromosomale DNA vorher sauber aufzureinigen. Dazu wurde ausreichend Zellmaterial von LB-Agarnährböden in 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 15 min bei 99 °C inkubiert (Eppendorf Thermomixer compact, 900 rpm), anschließend für weitere 15 min bei -70 °C schockgefroren und wieder für 15 min bei 99 °C inkubiert (900 rpm). Nach Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5415D, 15 min, 13.200 rpm, RT) wurden 20 µl des DNA-haltigen Überstands als Template in einem 50 µl-PCR-Ansatz verwendet.

2.4.4 *Overlap Extension*-PCR

Um Punktmutationen zu generieren oder DNA-Fragmente miteinander zu fusionieren, wurde die von Ho *et al.* (1989) beschriebene *Overlap Extension*-PCR verwendet (Abbildung 2–1): Zunächst wurden die einzelnen Fragmente mit den Primerpaaren **a/b** bzw. **c/d** so amplifiziert, dass sie entsprechend der Schmelztemperatur der Primerpaare an den zu fusionierenden Enden überlappende Sequenzen aufwiesen (20–30 bp). Die Primer **b** und **c** führten die gewünschten Mutationen ein. Für die Fusion wurden äquimolare Mengen der beiden Fragmente gemischt und mit den peripheren Primern **a/d** erneut eine PCR durchgeführt. Mithilfe dieser Methode konnten auch zwei beliebige DNA-Fragmente fusioniert werden.

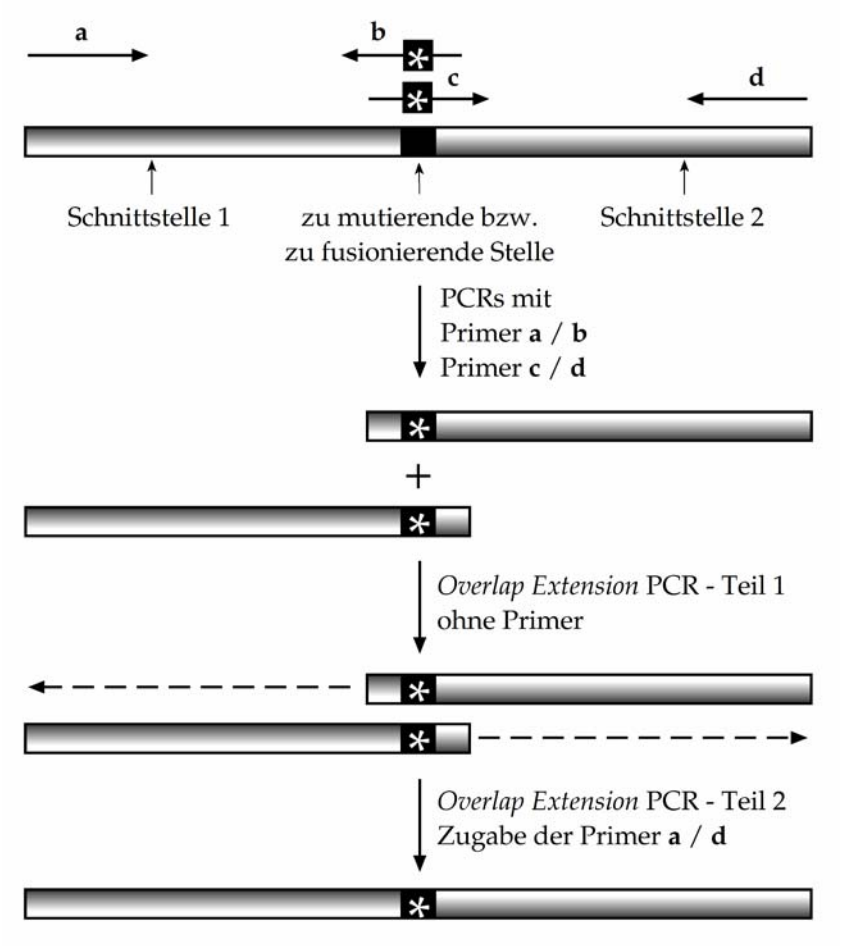


Abbildung 2-1: Schema der *Overlap Extension*-PCR für die Einführung von Punktmutationen (nach Ho *et al.*, 1989). Im ersten Schritt werden die flankierenden Regionen inkl. überlappendem Bereich (Mutation mit Stern gekennzeichnet) mithilfe der Primerpaare **a/b** und **c/d** über PCR amplifiziert. Die Fusion erfolgt in 2 PCR-Schritten: Zunächst werden die beiden Fragmente ohne Zugabe von Primern miteinander fusioniert, bevor im 2. Schritt nach Zugabe der flankierenden Primer **a/d** das fusionierte Produkt amplifiziert wird.

2.4.5 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in 0,7 %igen (w/v) Agarosegelen, die aus SeaKem®-LE-Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) und 1× TAE-Puffer hergestellt wurden. Die Zugabe von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µg ml^{-1} erfolgte in das abgekühlte, aber noch flüssige Gel. Als Laufpuffer wurde 1× TAE mit 0,4 µg ml^{-1} Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Auftragen wurde die aufzutrennende DNA mit 1× DNA-Auftragspuffer versetzt. Bei einer angelegten Spannung von 10 V pro cm Gellänge

erfolgte dann die Auftrennung nach Fragmentgröße. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid mit der DNA, womit diese durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht sichtbar wird. Als DNA-Längenstandard wurde der „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“ (Thermo Scientific) verwendet.
Für die Aufreinigung wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit“ nach Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde jeweils mit 25 µl Elutionspuffer eluiert.

2.4.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Messung der DNA-Konzentration wurden 3 µl einer Probe mithilfe des NanoPhotometer™ (Implen GmbH, München) analysiert. Als Referenz diente der jeweils verwendete Elutionspuffer. Jede Probe wurde dreifach gemessen und der Mittelwert berechnet.

2.4.7 Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten

Die Behandlung von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten mit Restriktionsenzymen erfolgte in 10 µl Ansätzen. Dabei wurden ca. 150 ng gereinigte DNA verwendet. Nach Zugabe von 1 µl Restriktionsenzym und 1 µl 10× Restriktionspuffer wurde der Ansatz mit VE H_2O auf 10 µl aufgefüllt und beim Temperaturoptimum des Restriktionsenzyms für ca. 90 min inkubiert. Musste die DNA mit weiteren Enzymen behandelt werden, deren Puffer unterschiedliche Zusammensetzungen aufwiesen, erfolgte zunächst eine Isopropanolfällung der DNA (s. Kapitel 2.4.8). Bei gleichem Puffer wurde ein 20 µl-Ansatz mit beiden Enzymen verwendet, vorausgesetzt die Schnittstellen lagen mind. 50 bp voneinander entfernt. Ansonsten wurde zunächst nur ein Enzym verwendet und anschließend (wenn möglich) hitzeinaktiviert. Es folgte eine Zugabe von 8 µl VE H_2O, 1 µl des zweiten Restriktionsenzyms sowie 1 µl 10× Restriktionspuffer und eine erneute Inkubation für ca. 90 min beim Temperaturoptimum. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte entweder über Agarosegelelektrophorese oder direkt mithilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits“ nach Protokoll des Herstellers.

2.4.8 Isopropanolfällung

Um DNA von Restriktionsenzymen und deren Puffer zu trennen, wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt. Der Restriktionsansatz wurde dazu mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 6,2) und 1 Volumen Isopropanol gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13.200 rpm, 10 min, RT) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 10 µl 100 % Ethanol gewaschen (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13.200 rpm, 3 min, RT), 5 min bei RT luftgetrocknet und wieder in 8 µl VE H_2O resuspendiert. Anschließend konnte durch Zugabe von 1 µl des zweiten Restriktionsenzyms sowie 1 µl 10× Restriktionspuffer die nächste Reaktion gestartet werden.

2.4.9 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Um bei Klonierungen eine Religation der Vektor-DNA zu verhindern, wurde diese nach Restriktion und Isopropanolfällung mit Alkalischer Phosphatase aus Kälbermagen (EC 3.1.3.1) behandelt. Dieses Enzym spaltet die 5′-Phosphatgruppe linearisierter DNA ab und verhindert somit eine Religation. Zu 8 µl gefällter DNA wurden 1 µl Alkalische Phosphatase (20 U μl^{-1}) und 1 µl 10× Phosphatasepuffer pipettiert und der Ansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert.

2.4.10 Behandlung mit Klenow Enzym

Um DNA-Fragmente mit versetzten Enden für *blunt end*-Ligationen verwenden zu können, wurden diese mit dem Klenow Enzym behandelt. Dadurch werden überstehende 5'-Enden mit dNTPs aufgefüllt bzw. überstehende 3′-Enden ohne Zugabe von dNTPs abgebaut. Die DNA wurde dafür mit 1 µl 10x Restriktionspuffer B (Roche), 1 µl 10 mM dNTP-Mix (optional) und 1 µl Klenow Enzym (2 U μl^{-1}) gemischt, mit VE H_2O auf 10 µl aufgefüllt und bei 37 °C für 20 min inkubiert.

2.4.11 Ligation

Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA erfolgte enzymatisch durch die T4 DNA Ligase in einem Volumen von 10 µl. Dabei wurde in den Ansätzen ein 3:1-molares Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA eingesetzt. Die Abschätzung erfolgte anhand der Bandenintensität auf den Agarosegelbildern. Pro Ansatz wurden neben der DNA 1 µl T4 DNA Ligase (5 U μl^{-1}) und 1 µl 10× Ligasepuffer zugegeben und mit VE H_2O auf 10 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für ca. 16 h bei 5 °C.

2.4.12 Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis* Zellen erfolgte mit dem „DNeasy Blood & Tissue Kit“ aus 5 ml ÜK nach Protokoll des Herstellers. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgte bei 5 °C.

2.4.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR- oder Plasmid-DNA wurde durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte dabei nach Vorschrift des Anbieters.

2.4.14 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Um die DNase I Footprinting Experimente (s. Kapitel 2.4.16) mithilfe des ALFexpress™ DNA Sequencers (ehemals Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) auswerten zu können, wurde parallel eine Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Dafür wurde das „AutoRead™ Sequencing Kit“ verwendet: Zunächst erfolgte eine Isopropanol-fällung von 10 µg aufgereinigter pSUN351.3-DNA. Diese wurde in 10 µl H_2O aufgenommen, mit 2 µl Cy5-markiertem Primer (10 µM) und 1,5 µl 1 M NaOH gemischt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µl 1 M HCl und 2 µl Annealing-Buffer zugegeben und gut gemischt. Nach 10 min bei 37 °C und weiteren 5 min bei RT wurden 1 µl Extension-Buffer und 3,5 µl DMSO zugegeben. Das Gemisch wurde daraufhin mit 1 µl T7-Polymerase und 1 µl Dilution-Buffer

versetzt. Je 5,5 µl wurden mit 3 µl vorgelegtem ddNTP-Mix (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) gemischt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Sequenzierreaktionen wurden durch Zugabe von 6 µl Stop-Buffer und Inkubation für 3 min bei 80 °C gestoppt. Jeweils 5 µl der vier Ansätze wurden auf ein 0,3 mm dickes Polyacrylamidgel (ReproGel High Resolution, GE Healthcare, München) aufgetragen und nach Protokoll des Herstellers aufgetrennt. Als Laufmittel diente 0,5× TBE.

2.4.15 Markerfreie chromosomale Deletionen in *B. subtilis*

Eine einfache Methode für markerfreie Modifikationen im Genom von *B. amyloliquefaciens* (Zakataeva *et al.*, 2010) wurde in dieser Arbeit für *B. subtilis* adaptiert. Die Methode ist effizient, schnell und benötigt keinen Stamm mit speziellem Genotyp: Für den chromosomalen Genknockout wurde der temperatursensitive (ts) Integrationsvektor pMW521.1 konstruiert (Abbildung 2–2), der auf dem Replicon des Plasmids pE194^{ts} aus *B. subtilis* 1E78 basiert (Gryczan *et al.*, 1982). Die Replikation von pE194^{ts} funktioniert bei Temperaturen über 30 °C nur sehr eingeschränkt bzw. überhaupt nicht mehr. Um die Replikationsfähigkeit und Temperatursensitivität zu überprüfen, wurde pMW521.1 über natürliche Transformation in *B. subtilis* 3NA gebracht. Die Transformanten wurden erneut auf LB$_{Sp}$-Agarnährböden ausgestrichen und für ca. 16 h bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Das beste Wachstum zeigte sich bei 30 °C, gefolgt von einem moderaten Wachstum bei 37 °C und keinem Wachstum bei 50 °C.

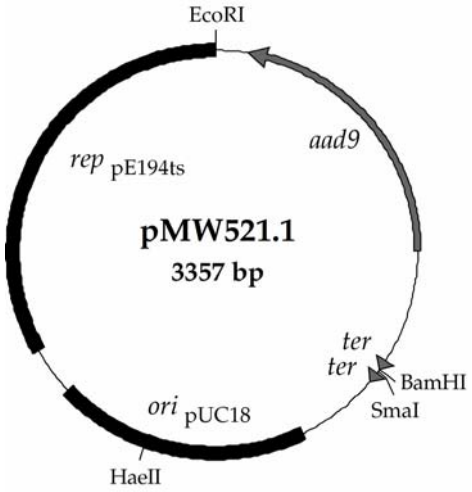


Abbildung 2-2: Plasmidkarte des temperatursensitiven Vektors pMW521.1 mit pE194^{ts}-Replicon. Eingezeichnet sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen.

Für chromosomale Gendeletionen, wurden die flankierenden Regionen (jeweils ca. 1 kb) des zu deletierenden Gens amplifiziert (Start- und Stopcodon blieben erhalten) und über 3-Fragment-Ligation in pMW521.1 gebracht. Die entstandenen Vektoren wurden in natürlich kompetente Zellen von *B. subtilis* gebracht. Über zwei aufeinander folgende Rekombinationsereignisse wurde dabei entweder das gewünschte Gen deletiert oder der ursprüngliche Zustand wiederhergestellt (Abbildung 2–3). Das Screening erfolgte über Kolonie-PCR.

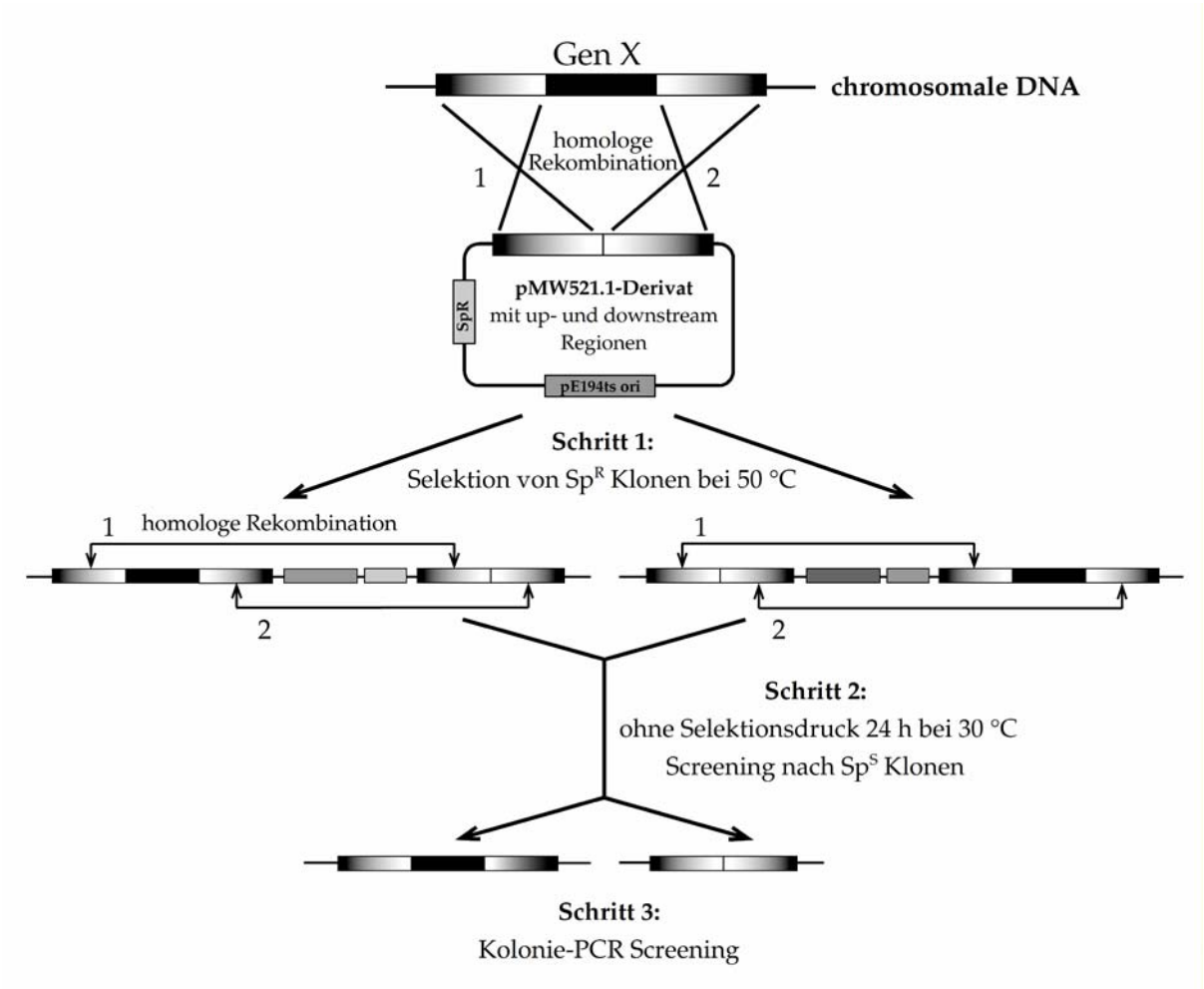


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Deletion eines chromosomalen Gens X in *B. subtilis* mithilfe von Derivaten des temperatursensitiven Integrationsvektors pMW521.1. Alternative, homologe Rekombinationsereignisse (Single-Crossover) sind mit „**1**“ und „**2**“ gekennzeichnet. Anstelle von Deletionen können mit dieser Methode auch Punktmutationen oder Insertionen eingeführt werden.

2.4.16 DNase I Footprinting Assay

Beim DNase I Footprinting Assay kann die Bindung eines Proteins an DNA sequenzgenau analysiert werden. Bei diesem Verfahren wird gewährleistet, dass die DNase I die an einem Ende markierte DNA nur einmalig schneidet. Rein statistisch gesehen sollten somit Fragmente sämtlicher Längen entstehen. Binden Proteine an die DNA, kann diese in diesem Bereich nicht mehr von der DNase I geschnitten werden. Bei der anschließenden Auftrennung der Fragmente im Polyacrylamidgel entsteht somit eine Lücke oder auch „Fußabdruck" (engl. *footprint*).

Die Proteinbindung wurde in einem 30 µl-Ansatz, bestehend aus 6 µl 5× Gelmobility-shift-Assay-Puffer, 2 µl Cy5-markierter DNA (5 ng μl^{-1}) und der Proteinlösung bzw. Negativ-Kontrolle durchgeführt. Nach 30 min Inkubation bei 5 °C wurden 5 µl 10× DNase I Reaktionspuffer, 13 µl VE H_2O, sowie 2 µl DNase I (2 U μl^{-1}) zugegeben. Nach 1 min bei RT wurden 50 µl DNase I Stopp-Puffer sowie 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) zugegeben und gut gemischt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 13.200 rpm, RT) wurden 75 µl der wässrigen Phase mit 150 µl eisgekühltem 100% Ethanol gemischt. Bei -70 °C wurde dann für mind. 2 h die DNA gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (Heraeus Biofuge *fresco*, 15 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde das DNA-Pellet zunächst mit 150 µl eisgekühltem 100% Ethanol gewaschen (Heraeus Biofuge *fresco*, 3 min, 13.000 rpm, 4 °C). Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde mit 9 µl VE H_2O resuspendiert, mit 6 µl Stop-Buffer (aus dem „AutoRead™ Sequencing Kit") gemischt und 3 min bei 80 °C erhitzt. Mithilfe des ALFexpress™ DNA Sequencers (ehemals Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) wurden jeweils 7 µl des Gemischs auf einem 0,3 mm dicken Polyacrylamidgel (ReproGel High Resolution, GE Healthcare, München) bei 55 °C parallel zur Sequenzierungsreaktion (s. Kapitel 2.4.14) nach Protokoll des Herstellers aufgetrennt. Als Laufmittel wurde 0,5× TBE verwendet.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Zellaufschluss und Herstellung von Protein-Rohextrakten

Um Protein-Rohextrakte aus den geernteten *E. coli* bzw. *B. subtilis* Zellen zu erhalten, wurden die eingefrorenen Zellpellets je nach Verwendungszweck in verschiedenen Puffern resuspendiert (Tabelle 2–16).

Tabelle 2-16: Resuspendierung der Zellpellets je nach Verwendungszweck.

Verwendungszweck	Zellmenge	Puffer
SDS-PAGE-Analyse	1×10^{10}	1 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7)
Gelmobilityshift Assay	1×10^{10}	1 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7)
His_6-tag-Aufreinigung	3×10^{10}	1 ml Ni-NTA-Lysepuffer
Strep-tag-Aufreinigung	3×10^{10}	1 ml Puffer W

Die resuspendierten Zellen wurden anschließend auf Eis mit Ultraschall aufgeschlossen (SONOPULS HD2070, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin). Der Aufschluss erfolgte pulsierend (50% *duty cycle*) für 1-2 × 30 s (*E. coli*) bzw. 3 × 45 s (*B. subtilis*). Um die lösliche von der unlöslichen Proteinfraktion zu trennen, wurde der Aufschluss abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *fresco*, 13.000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand mit der löslichen Proteinfraktion wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und das Pellet mit der unlöslichen Proteinfraktion wiederum in 1 ml Puffer resuspendiert. Die Proben wurden i.d.R. sofort weiterverwendet bzw. für maximal 16 h auf Eis gelagert.

2.5.2 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Für die chromatographische Trennung von Proteinen mit His_6- (Hochuli *et al.*, 1987) bzw. *Strep*-Affinitätstag kamen Säulen zum Einsatz, die zuvor mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (QIAGEN GmbH, Hilden) bzw. *Strep*-Tactin® Sepharose® (IBA GmbH, Göttingen) gepackt worden waren. Die Säulen wurde zunächst mit 2 ml Ni-NTA-Lysepuffer bzw. Puffer W equilibriert. Der lösliche Überstand aus dem Zellaufschluss von jeweils 3×10^{10} Zellen wurde komplett auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Es folgten 5 Waschschritte mit jeweils 1 ml Ni-NTA-

Waschpuffer bzw. Puffer W. Die Elution erfolgte mit 6 × 0,5 ml Ni-NTA-Elutionspuffer bzw. Puffer E. Die Aufreingung wurde durch SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Fraktionen verfolgt. Die Ni-NTA-Agarose bzw. *Strep*-Tactin® Sepharose® Säulen wurden vor der nächsten Aufreinigung mit 5 ml Ni-NTA-Lysepuffer bzw. 3 × 5 ml Puffer R und 5 ml Puffer W regeneriert und wieder equilibriert.

2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Methode dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen, die auf der Bindung von Coomassie-Brillant-Blau G-250 an Proteine beruht (Bradford, 1976). Die ungebundene, rote Form des Farbstoffs hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen Form stabilisiert und das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschoben (Compton und Jones, 1985).

Die Proteinbestimmung wurde wie folgt durchgeführt: Zu 20 µl Proteinlösung wurden 1 ml im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünntes „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) zugegeben, für 5 min bei RT inkubiert, und die OD bei 595 nm bestimmt. Als Leerwert wurden 20 µl des verwendeten Puffers, in dem die Proteine gelöst wurden, mit 1 ml der verdünnten Farblösung versetzt. Die OD_{595} des Leerwerts wurde vom Probenmesswert abgezogen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zuvor eine Eichgerade mit definierten BSA-Lösungen (0 - 1,0 mg ml^{-1}) erstellt. Aus der Geradengleichung konnte die gemessene OD_{595} einer Proteinkonzentration zugeordnet werden.

2.5.4 ManR-Aktivierungsassay

Die Aktivierung von *B. subtilis* ManR mit C-terminalem *Strep*-Affinitätstag, welches mit *E. coli* JM109 pSUN246.1 produziert und anschließend aufgereinigt wurde, erfolgte in einem 100 µl-Ansatz durch Inkubation von 266 nM (2 µg) ManR-*Strep* mit 317 nM (2 µg) HPr-His_6, 1,5 µM (2 µg) EI-His_6, 5 mM PEP, 5 mM $MgCl_2$ und 50 mM TRIS/HCl (pH 7,5) für 30 min bei 37 °C.

2.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970): Jeweils 12 µl Protein-Lösung wurden mit 3 µl 5× SDS-Auftragspuffer gemischt. Nach erfolgter Denaturierung der Proteine mittels Detergens (SDS), Reduktionsmittel (β-Mercaptoethanol) und Hitze (5 min bei 99 °C; Eppendorf Thermomixer compact) wurden die Proben für ca. 5 min bei RT abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Für die SDS-PAGE wurde ein denaturierendes Polyacrylamidgel bestehend aus Sammel- und Trenngel mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad und pH-Wert verwendet (Tabelle 2–17).

Tabelle 2-17: Zusammensetzung des aus Sammel- und Trenngel bestehenden, denaturierenden Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE. Die polymerisierten Gele wurden entweder sofort verwendet oder bei 5 °C bis zu 4 Wochen feucht gelagert.

Komponente	Sammelgel (3%)	Trenngel (12%)	Trenngel (15%)
VE H_2O	3,00 ml	6,70 ml	4,70 ml
TRIS (0,5 M pH 6,8)	1,25 ml	-	-
TRIS (1,5 M pH 8,8)	-	5,00 ml	5,00 ml
SDS (10% w/v)	0,05 ml	0,20 ml	0,20 ml
Rotiphorese® Gel 30*	0,67 ml	8,00 ml	10,00 ml
APS (10% w/v)	0,05 ml	0,10 ml	0,10 ml
TEMED	0,01 ml	0,02 ml	0,02 ml

* 30% Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1

Die Proben wurden zunächst bei 10 mA in einem 3%igen Sammelgel bei neutralem pH vor dem Übergang zum Trenngel aufkonzentriert, bevor sie in diesem bei 20 mA und basischem pH aufgetrennt wurden. Als Laufmittel wurde ein TRIS-Glycin-Puffersystem verwendet. Als Längenstandards dienten der „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ bzw. der „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“ (beide Thermo Scientific). Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenol-Front aus dem Trenngel herausgelaufen war. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie-Färbung: Nach Inkubation der Gele für 25 min bei RT in Färbelösung erfolgte für weitere 25 min bei RT eine Behandlung mit Entfärbelösung.

Durch weitere, mehrstündige Inkubation der Gele in 7,5%iger (v/v) Essigsäure wurde der ungebundene Farbstoff vollständig aus den Gelen entfernt, wobei die Proteinbanden sichtbar wurden.

2.5.6 Gelmobilityshift Assay

Die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes wurde durch einen elektrophoretischen Gelmobilityshift Assay nachgewiesen, der prinzipiell wie zuvor beschrieben durchgeführt wurde (Rother *et al.*, 1999; Shewchuk *et al.*, 1989): Für den Nachweis der Protein-Bindung an DNA wurde diese zunächst über PCR amplifiziert und dabei jeweils der codierende bzw. nicht-codierende Strang am 5′-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Die gleichen Fragmente wurden ebenfalls mit unmarkierten Primern amplifiziert, die für Konkurrenzreaktionen eingesetzt wurden. Die Protein-Bindung an die DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Dabei wurden 3 – 5 nM gereinigte und Cy5-markierte DNA und eine variable Menge an Protein-Rohextrakt oder gereinigtem, aktiven Protein eingesetzt. Die Bindung erfolgte für 30 min bei 8 °C in 1× Gelmobilityshift-Assay-Puffer. Die Protein-DNA-Komplexe wurden neben einem Farbmarker für ca. 60 min bei 20 mM auf einem 6%igen, nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die Herstellung solcher Gele wurden 4 ml Rotiphorese® Gel 30, 400 µl 50× TAE und 15,4 ml VE H_2O gut gemischt bevor die Polymerisation durch Zugabe von 20 µl TEMED und 200 µl 10% (w/v) APS gestartet wurde. Die Detektion der fluoreszierenden DNA-Banden erfolgte mithilfe des „Storm 860 PhosphorImager“ Systems (ehemals Molecular Dynamics, jetzt GE Healthcare, München). Die Experimente wurden unabhängig voneinander mindestens dreimal wiederholt und reproduziert.

2.5.7 Bestimmung von K_D und k_{diss}

Die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und der Dissoziationsrate k_{diss} von ManR erfolgte im Prinzip wie zuvor beschrieben (Rother *et al.*, 1999). K_D wurde durch Gelmobilityshift Assays wie folgt bestimmt: Abnehmende Mengen von gereinigtem und aktiviertem ManR-*Strep* (140, 70, 20, 14, 7, 2 und 1,4 ng entsprechend 186, 93, 26,5, 18,6, 9,3, 2,7 und 1,9 nM) wurden für 30 min bei 5 °C mit

jeweils 5 nM Cy5-markiertem DNA-Fragment mit der P_{manR}- bzw. P_{manP}-Region inkubiert, um einen stabilen Protein-DNA-Komplex auszubilden. Nach erfolgter Elektrophorese im nativen Polyacrylamidgel wurden die Intensitäten der entstandenen Banden mithilfe der ImageQuant Software (Version 5.2, Molecular Dynamics) bestimmt. Das Verhältnis von freien und gebundenen DNA-Molekülen konnte so berechnet und gegen die im Assay verwendete Menge an ManR aufgetragen werden. Aus dem Diagramm konnte so die Menge an ManR abgelesen werden, die notwendig war, um 50% der verwendeten DNA zu binden. Der K_D-Wert ergab sich nach Umrechnung in die entsprechende Molarität.

Die Bestimmung der Dissoziationsrate k_{diss} und der entsprechenden Halbwertszeit erfolgte ebenfalls durch Gelmobilityshift Assays. In einem Gesamtvolumen von 100 µl wurden 186 nM aufgereinigtes und aktiviertes ManR-*Strep* sowie 5 nM Cy5-markiertes DNA-Fragment mit der P_{manR}- bzw. P_{manP}-Region gemischt und für 30 min bei 5 °C inkubiert. Die Dissoziation von ManR von der Cy5-markierten DNA wurde durch Zugabe eines 50× molaren Überschusses an unmarkiertem DNA-Fragment eingeleitet. Alle 10 min wurden 10 µl-Proben genommen und auf ein laufendes, natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Intensität der entstandenen Banden wurde mithilfe der ImageQuant Software (Version 5.2, Molecular Dynamics) bestimmt. Die Werte für die gebundene DNA wurden logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Ausgehend von der Geradengleichung nach dem allgemein gültigen Zerfallsgesetz wurden die k_{diss}-Werte und die Halbwertszeit $t_{½}$ bestimmt:

$$c_{DNA}(t) = c_{DNA}(t=0) \cdot e^{-k_{diss} \cdot t} \rightarrow \text{mit } C_{DNA}(t) = C_{DNA}(t)/2 \rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{diss}}$$

mit $\mathbf{C_{DNA}(t)}$ = Konzentration des ManR-DNA-Komplexes zum Zeitpunkt **t**

2.5.8 β-Galaktosidase Assay

Die Messung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte prinzipiell wie zuvor beschrieben (Miller, 1972): Zunächst wurde eine *B. subtilis* ÜK in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum angezogen. Die Hauptkultur wurde 1:100 aus der ÜK angeimpft und nach ca. 2 h Inkubation bei 37 °C ($OD_{600} \approx 0{,}4$) mit 0,2 % (w/v) D-Mannose induziert.

Nach 1 h bei 37 °C wurde die OD_{600} bestimmt. Anschließend wurden 100 µl Zellkultur mit 900 µl Z-Puffer und 10 µl Toluol gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Unter dem Abzug wurde dem Gemisch das Toluol für 15 min bei RT wieder entzogen. Für die Messung der β-Galaktosidaseaktivität wurden 200 µl 20 mM eisgekühlte o-NPG-Lösung zugegeben, und die Zeit bis zur Gelbfärbung der Lösung gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M Na_2CO_3 gestoppt, und sofort die OD_{420} und OD_{550} gemessen. Die Eichung erfolgte gegen Z-Puffer. Die Berechnung der Enzymaktivität in Miller Units (M.U.) erfolgte gemäß:

$$\text{Aktivität [Miller Units]} = 1.000 \cdot \frac{OD_{420} - (1{,}75 \cdot OD_{550})}{t \cdot V \cdot OD_{600}}$$

mit t = Zeit (min), V = Probenvolumen (0,1 ml)

2.5.9 Spektrophotometrische Fluoreszenzmessungen

Bei Schüttelkolbenexperimenten wurde die spezifische Fluoreszenz mithilfe des GENios Multifunktionsreaders (Tecan GmbH, Crailsheim) und der zugehörigen Readersoftware XFluor4 (Version V4.11) bestimmt. Dafür wurden die Messproben zunächst mit dem für die Anzucht verwendeten Kulturmedium auf eine OD_{600} = 0,3 verdünnt. Davon wurden 2 × 100 µl in eine 96-well Mikrotiterplatte mit Flachboden pipettiert. Als Leerwert wurden bei jedem Messvorgang 2 × 100 µl Kulturmedium verwendet.

Während der Fermentation von *B. subtilis* Stämmen wurde die Fluoreszenzmessung offline mithilfe eines SpectraFluor Multifunktionsreaders (Tecan GmbH, Crailsheim) und der Readersoftware XFluor4 (Version V4.11) durchgeführt, um über eine Relation die online-Werte der Reaktorsonde quantifizieren zu können. Hierfür wurden 3 × 250 µl der Kultur (ggf. mit VK2-Medium verdünnt) in eine 96-well Mikrotiterplatte mit Flachboden pipettiert. Als Leerwert wurden 3 × 250 µl VK2-Medium verwendet.

Mit den in Tabelle 2–18 aufgelisteten Messparametern wurden relative Fluoreszenzeinheiten (RFE) gemessen. Die endgültige Fluoreszenz ergab sich aus der Differenz vom Mittelwert der Proben und dem gemittelten Leerwert.

Tabelle 2-18: Messparameter für den GENios und SpectraFluor Reader.

Messparameter	Wert
Excitation Filter	485 nm
Emission Filter	535 nm
Gain (manual)	60
Integration time	20 µs
Number of flashes	3
Read mode	Top

2.6 Fed-Batch-Fermentationen mit *B. subtilis* TQ356

Am IBVT der Universität Stuttgart wurden unter technischer Hilfestellung Hochzelldichtefermentationen im Fed-Batch-Betrieb durchgeführt. Die dafür verwendeten Medien sind der Tabelle 2–8 (Kapitel 2.2.5) zu entnehmen.

2.6.1 Anzucht der Vorkulturen

Ausgehend von *B. subtilis* Einzelkolonien (auf LB-Agarnährboden) wurde zunächst eine ÜK in 5 ml VK1-Medium mit Antibiotikum angezogen. Für die erste Vorkultur wurden 20 ml VK1-Medium mit Antibiotikum mit 1 ml der ÜK angeimpft und für 5 – 6 h in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben bei 37 °C inkubiert (Schüttler, 200 rpm). Für die zweite Vorkultur wurden jeweils 10 ml der ersten Vorkultur in 2 × 200 ml Batch-Medium überführt und in einem 1 l-Erlenmeyerkolben bei 37 °C weitere 6 h inkubiert (Schüttler, 200 rpm). Für die Inokulierung wurden 400 ml der zweiten Vorkultur mit einer OD_{600} zwischen 1,2 und 2,0 verwendet.

2.6.2 Fed-Batch-Fermentation im 30 L-Bioreaktor

Die Fed-Batch-Fermentationen im 30 L-Bioreaktor (Fabrikate D 598 bzw. D 596, Fa. Bioengineering AG, Wald, Schweiz) starteten mit 8 l Batchmedium. Nach Inokulierung mit 400 ml der zweiten Vorkultur, wurde die Batch-Phase bei 30 °C, 1,5 bar und einer Begasungsrate von 10 l Luft min^{-1} gestartet. Der pH-Wert wurde mit 24% (v/v) NH_4OH und 30% (v/v) Phosphorsäure auf 7,0 geregelt. Um Schaum-

bildung durch Verringerung der Oberflächenspannung zu verhindern, wurden alle 4 h einige Tropfen Antischaummittel zugegeben.

Der Umschaltzeitpunkt von Batch- auf Zufütterungsphase ergab sich anhand des vollständigen Verbrauchs der Kohlenstoffquelle (D-Glucose). Dieser war durch einen schnellen Anstieg des Sauerstoff-Partialdrucks pO_2 im Reaktor gekennzeichnet. Während der Übergangsphase und in der Zufütterungsphase wurde die Glucose-Konzentration regelmäßig mithilfe des ACCU-CHEK Aviva (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) oder des automatischen offline Analysesystems LaboTRACE (TRACE Analytics GmbH, Braunschweig) nach Anweisung der jeweiligen Hersteller kontrolliert. Die Steuerung des Feeds erfolgte mithilfe der Biolog 1.7 Software (IBVT). Die Zugabe der Feed-Lösungen I und II erfolgte exponentiell im Verhältnis 81:19, um eine konstante Wachstumsrate $\boldsymbol{\mu_{set}}$ = 0,10 h^{-1} zu erhalten. Der Gesamtfeed **F** zum Zeitpunkt **t** berechnete sich gemäß der Formel:

$$F(t) = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot \frac{c_{x_0} \cdot V_0}{c_{s_0}} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t}$$

mit m = Erhaltungskoeffizient [0,44 mmol g^{-1} h^{-1} (nach Sauer *et al.*, 1996)]

$Y_{X/S}$ = spezifischer Ausbeutekoeffizient von Biomasse zu Substrat [0,5 für Glucose]

c_{x0} = Biomassekonzentration zu Beginn der Zufütterungsphase

V_0 = Reaktorvolumen zu Beginn der Zufütterungsphase [= Batchvolumen]

c_{s0} = Glucose-Konzentration in der Feedlösung

t = Zeit in h

2.6.3 Bestimmung der Biotrockenmasse

Um eine Aussage über die aktuelle Biotrockenmassekonzentration c_x zu erhalten, wurde bei jeder Fermentation ein Korrelationsfaktor R von OD_{600} zu c_x bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit dem Feuchtebestimmer MB835 Halogen (Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA). Ab einer $OD_{600} \approx 30$ wurden dem Bioreaktor 20 ml-Proben entnommen. 10 ml davon wurden direkt mit dem Feuchtebestimmer getrocknet und das resultierende Gewicht bestimmt ($\mathbf{m_{Zellen}}$). Um das Gewicht des Kulturmediums zu bestimmen, wurden die restlichen 10 ml abzentrifugiert (Heraeus

Megafuge, 10 min, 4.500 rpm, RT). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, mit dem Feuchtebestimmer getrocknet und die Masse bestimmt (**m_{Medium}**). Bei bekannter OD_{600} konnte nach folgender Formel der Korrelationsfaktor **R** berechnet werden:

$$R = \frac{\left(\frac{m_{Zellen} - m_{Medium}}{V}\right)}{OD_{600}} \; [g\ l^{-1}\ OD_{600}^{-1}] \text{ mit } V = 0{,}01\ l$$

2.6.4 Online-Fluoreszenzmessung im Bioreaktor

Mit einer Fluoreszenzsonde (Mikropack HPX-2000 High Power Xenon Lightsource mit S2000 Fibre Optic Spectrometer [Ocean Optics, Inc., Ostfildern] und Neutralglasfilter der Dichte 0,6 [ITOS GmbH, Mainz]) wurde während der Fermentation die Bildung von eGFP online verfolgt. Die Anregung erfolgte durch einen 485/20 nm Bandpassfilter. Das Emissionslicht wurde bei 535 nm detektiert und mithilfe der Ocean Optics SpectraSuite Software die Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzeinheiten (*counts*) ausgegeben. Da die Software eine obere Detektionsgrenze von 4.000 counts vorgab, wurde die Integrationszeit vor Erreichen dieser Grenze von ursprünglich 50 ms schrittweise auf 25 bzw. 10 ms herabgesetzt. Die detektierte Emissionsstrahlung wurde so auf die Hälfte bzw. ein Fünftel pro Messvorgang reduziert. Um diese „optische Verdünnung“ wieder auszugleichen, wurden die Messwerte wieder mit dem Faktor 2 bzw. 5 multipliziert.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Promotorregionen P_{manR} und P_{manP}

Die Transkriptionsstarts in den Promotorregionen des Regulatorgens *manR* (P_{manR}) und des *manPA-yjdF* Operons (P_{manP}) wurden durch Primer Extension Experimente bereits bestimmt (Sun und Altenbuchner, 2010). Ein Sequenzvergleich von P_{manR} und P_{manP} offenbarte in beiden Fällen stromaufwärts der potentiellen -35-Region sich gegenläufig wiederholende Sequenzen, sogenannte *Inverted Repeats* (IR). Es wurde angenommen, dass sie die Bindestellen für den Regulator ManR darstellen (Sun und Altenbuchner, 2010). Da bisher aber kein aktives ManR gewonnen werden konnte, konnte auch die Lage des Operators nicht genau ermittelt werden. Darüber hinaus blieb auch die Beobachtung ungeklärt, warum die Expression des Reportergens *lac*Z unter Kontrolle von P_{manR} trotz seiner perfekten -10-Region (TATAAT-Konsensus-sequenz für den Sigma-Faktor σ^A) zu viel geringeren Expressionsraten führt als mit P_{manP} (TACAGT). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst auf diese beiden Fragestellungen näher eingegangen werden.

3.1.1 Sequenzbasierte Analyse und Modifikation der Promotorregionen

Die Promotorregionen P_{manR} und P_{manP} wurden einem erneuten Sequenzvergleich unterzogen. Dabei wurden 44 bp lange, zu 59 % identische Sequenzen jeweils von Position -75 bis -32 entdeckt, die mit den vermeintlichen -35-Regionen überlappen (Abbildung 3–1). Diese 44-bp Regionen schlossen die von Sun und Altenbuchner (2010) definierten IRs mit ein. Darüber hinaus wurden neue IRs in dieser Region definiert. Interessanterweise kommt das 14 bp lange Motiv AAAATCGCTTTTTT, welches am 5′-Ende der 44-bp Region von P_{manR} zu finden ist, in umgekehrter Reihenfolge auch am 3′-Ende der 44-bp Region von P_{manP} vor. Dies führte zu der Annahme, dass diese Sequenzmotive die äußeren Grenzen der Operatoren darstellen.

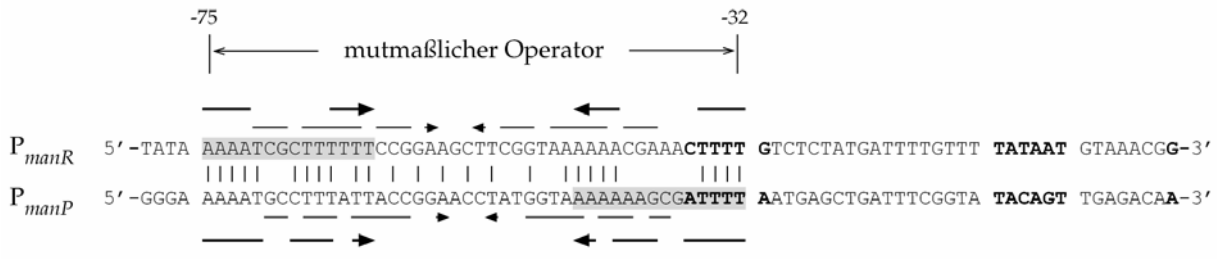


Abbildung 3-1: Sequenzvergleich der P_{manR}- und P_{manP}-Promotorregionen (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Transkriptionsstarts und die daran abgeleiteten Promotorelemente sind fett gedruckt. Die durch Sun und Altenbuchner (2010) identifizierten *Inverted Repeats* (IRs) sind durch dünne Pfeile über der P_{manR}- bzw. unterhalb der P_{manP}-Sequenz dargestellt. Dicke Pfeile repräsentieren die in dieser Arbeit neu identifizierten IRs. Die mutmaßliche Lage des Operators von Position -75 bis -32 ist gekennzeichnet. Die identifizierten 14 bp langen Motive sind grau hinterlegt.

Der Expressionsvektor pSUN290 (s. Anhang) enthält das pBS72-Replicon (Kopienzahl ca. 5-6 pro Zelle) und das Reportergen *lacZ* (β-Galaktosidase) unter Kontrolle der P_{manP}-Region, die sich bis zur Position -80 erstreckt und eine vollständige Induktionsfähigkeit mit D-Mannose gewährleistet (Sun und Altenbuchner, 2010). Ausgehend von pSUN290 wurde über PCR die Promotorregion bis zur Position -75 verkürzt (pMW712.2), die vermutlich die Grenze des Operators darstellt. Bereits zuvor wurden Vektoren mit Deletionen bis zur Position -67 (pSUN380.1) und -53 (pSUN381.1) konstruiert (Sun und Altenbuchner, 2010). Diese Vektoren wurden in natürlich kompetente Zellen von *B. subtilis* 3NA gebracht. Von jeweils drei der Transformanten wurde die Basalaktivität der β-Galaktosidase sowie die Aktivität nach Induktion (Mannose) und bei Katabolitrepression (Mannose und Glucose) gemessen und miteinander verglichen (Abbildung 3–2). Im Vergleich zu pSUN290 (-80) wurde mit pMW712.2 (-75) keine signifikante Veränderung des Expressionsverhaltens festgestellt. Die Deletion bis zur Position -67 (pSUN380.1) führte hingegen zu einer Verringerung der Aktivität um fast 50%. Bei der Deletion bis zur Position -53 (pSUN381.1) konnte keine signifikante Aktivität mehr festgestellt werden. Geht man von der Notwendigkeit des Operators für die Aktivierung aus, so sind diese Ergebnisse konform mit dessen mutmaßlicher Position.

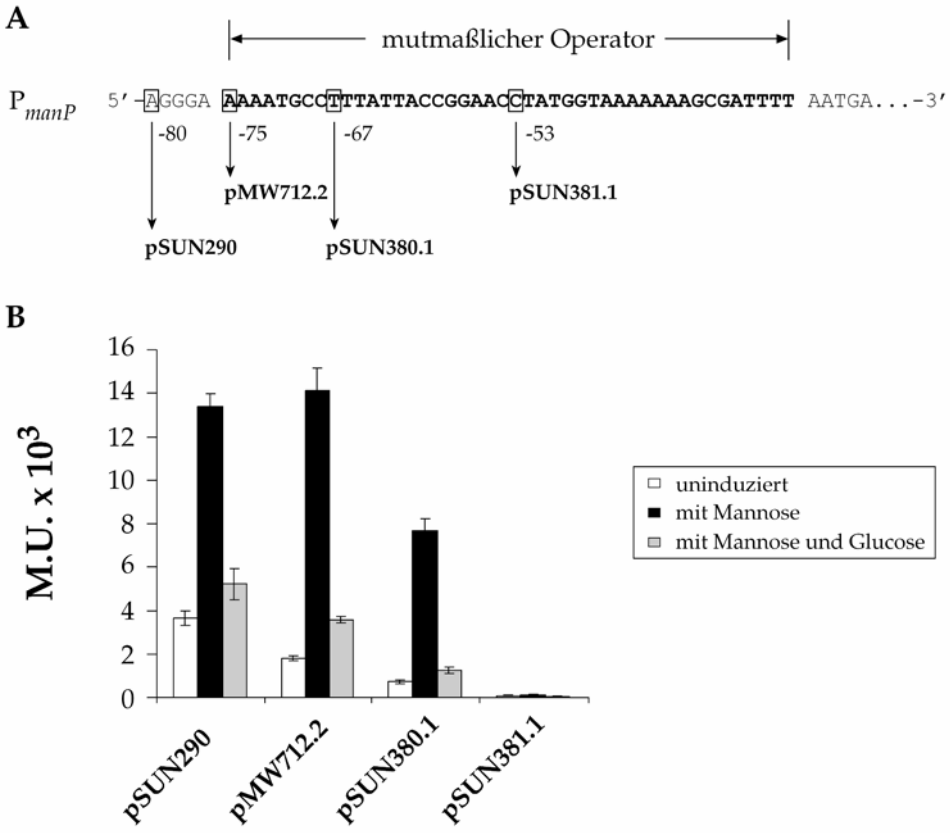


Abbildung 3-2: Deletionsanalyse der P_{manP}-Region (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). (A) Relevante Sequenzen (ab Position -80) der *lac*Z-Expressionsvektoren mit Deletionen in der P_{manP}-Promotorregion. Die mutmaßliche Operatorsequenz ist fett hervorgehoben. (B) β-Galaktosidase-Aktivitäten von *B. subtilis* 3NA mit *lac*Z-Expressionsvektoren mit P_{manP} bis Position -80 (pSUN290) und mit verkürzten Promotorsequenzen bis Position -75 (pMW712.2), bis Position -67 (pSUN380.1) und bis Position -53 (pSUN381.1). Die Basalaktivität (uninduziert) sowie die Aktivitäten nach Induktion (0,2 % (w/v) Mannose) und bei Katabolitrepression (jeweils 0,2 % (w/v) Mannose und Glucose) wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

3.1.2 Aufklärung der unterschiedlichen Expressionsniveaus

Experimente haben gezeigt, dass mit P_{manR} ein fast um die Hälfte niedrigeres Expressionsniveau erreicht wird als mit P_{manP} (Sun und Altenbuchner, 2010). P_{manR} besitzt mit 5´-TATAAT-3´ die optimale σ^A-Konsensussequenz für die -10-Region, während P_{manP} mit 5´-TACAGT-3´ zwei Abweichungen aufweist (Abbildung 3–1). Bei beiden Promotoren weichen die potentiellen -35-Regionen stark von der σ^A-

Konsensussequenz 5´-TTGACA-3´ ab. Daher sollte P_{manR} theoretisch den stärkeren der beiden Promotoren darstellen. Die Ursache für diese Diskrepanz sollte durch den Austausch verschiedener Sequenzen in der P_{manR} Promotorregion untersucht werden:

Zunächst wurde der P_{manR}-*lacZ*-Expressionsvektor pSUN291 (s. Anhang) über mehrere Klonierungsschritte so modifiziert, dass über zusätzliche Restriktionsschnittstellen die geplanten Modifikationen einfacher durchgeführt und überprüft werden konnten. In dem resultierenden Vektor pMW692.1 (s. Anhang) wurde dabei auch die *cre*-Sequenz entfernt, von der angenommen wurde, die Transkriptionsrate negativ beeinflussen zu können. Anschließend wurden die mutmaßlichen Operatorsequenzen (pMW720.1), die Region zwischen den -10- und -35-Promotorelementen (pMW711.2) sowie die 5′-untranslatierte Region (5′-UTR; pMW722.4) ausgetauscht. Die relevanten Sequenzen der konstruierten Vektoren sind in Tabelle 3–1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Sequenzen der Promotorregion von Position -80 bis zum ATG-Startcodon der *lacZ*-Expressionsvektoren (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Die mutmaßliche Operatorsequenz, die -10-Region und der Transkriptionsstart sind fett hervorgehoben. Eingefügte Restriktionsschnittstellen (XbaI, BglII, EcoRV und XhoI) sind kursiv markiert.

Vektor	Relevante Sequenz (5' → 3' Richtung)
von Position -80 bis +1	
pSUN290	AGGGA **AAAATGCCTTTATTACCGGAACCTATGGTAAAAAAAGCGATTTT** AATGAGCTGATTTCGGTA **TACAGT** TGAGACA **A**
pSUN291	GTATA **AAAATCGCTTTTTTCCGGAAGCTTCGGTAAAAAACGAAACTTTT** GTCTCTATGATTTTGTTT **TATAAT** GTAAACG **G**
pMW692.1	GGTTA **AAAATCGCTTTTTTCCGGAAGCTTCGGTAAAAAACGAAACTTTT** G*TCTAGATCT*TTTTGTTT **TATAAT** GTTATAG **G**
pMW720.1	GGTGA **AAAATGCCTTTATTACCGGAACCTATGGTAAAAAAAGCGATTTT** AATG*AGATCT*TTTTGTTT **TATAAT** GTTATAG **G**
pMW711.2	GGTTA **AAAATCGCTTTTTTCCGGAAGCTTCGGTAAAAAACGAAACTTTT** GATGAGCTGATTTCGGTA **TATAAT** GTTATAG **G**
pMW722.4	GGTTA **AAAATCGCTTTTTTCCGGAAGCTTCGGTAAAAAACGAAACTTTT** G*TCTAGATCT*TTTTGTTT **TATAAT** GTTATAG **A**
von Position +1 bis zum ATG-Startcodon	
pSUN290	**A**GATCTTATTATTCACACTTTCTAGAAATAATTTT----------CTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**
pSUN291	**G**TTTCTTATATAGTATACTTATACTATCAATTTGCTCAAGTAGATACTGACAGGCTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**
pMW692.1	***G****ATATCTCGAG*AGTATACTTATACTATCAATTTGCTCAAGTAGATACTGACAGGCTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**
pMW720.1	***G****ATATCTCGAG*AGTATACTTATACTATCAATTTGCTCAAGTAGATACTGACAGGCTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**
pMW711.2	***G****ATATCTCGAG*AGTATACTTATACTATCAATTTGCTCAAGTAGATACTGACAGGCTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**
pMW722.4	**A**GATCTTATTATTCACACTTTCTAGAAATAATTTT----------CTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**

Die neu konstruierten Vektoren, sowie pSUN290 (P_{manP}) und pSUN291 (P_{manR}) als Kontrollen, wurden in natürlich kompetente Zellen von *B. subtilis* 3NA gebracht. Von jeweils drei Transformanten wurde ein β-Galaktosidase-Aktivitätstest unter nicht-induzierten (Basalexpression) und induzierten Bedingungen (Mannose) sowie bei Katabolitrepression (Mannose und Glucose) durchgeführt (Abbildung 3-3).

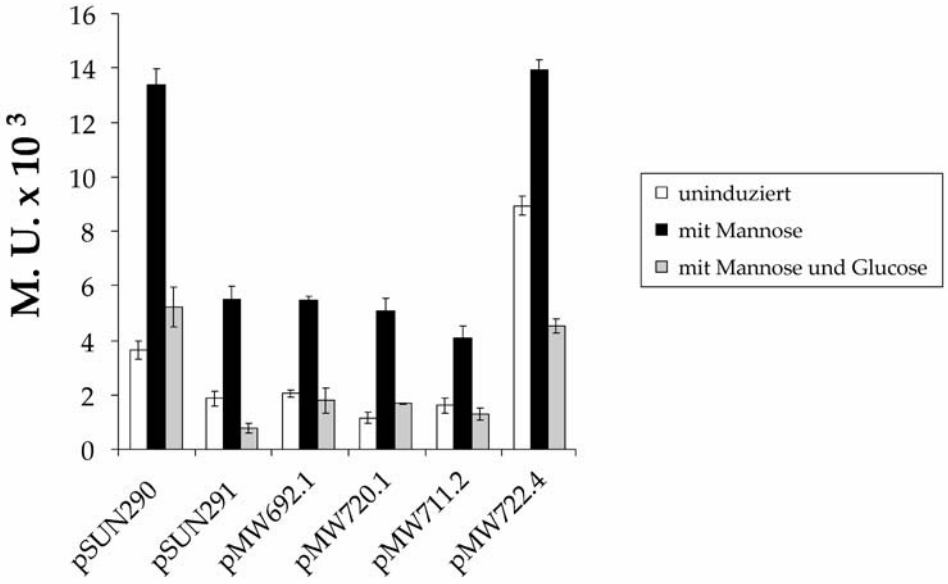


Abbildung 3-3: Aufklärung des unterschiedlichen Expressionsniveaus (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). β-Galaktosidase-Aktivitäten von *B. subtilis* 3NA mit pSUN290 (P_{manP}), pSUN291 (P_{manR}), pMW692.1 (pSUN291-Derivat ohne *cre*-Sequenz), pMW720.1 (Sequenz zwischen -35 und -10 ausgetauscht), pMW711.2 (Operator ausgetauscht) und pMW722.4 (5′-UTR ausgetauscht). Die Basalaktivität sowie die Aktivitäten nach Induktion (0,2 % (w/v) Mannose) und bei Katabolitrepression (je 0,2 % (w/v) Mannose und Glucose) wurden in drei unabhängigen Experimenten gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Im Vergleich zum Kontrollvektor pSUN291 (P_{manR}) zeigten die Zellen mit pMW692.1 aufgrund der fehlenden *cre*-Sequenz eine fast doppelt so hohe Aktivität bei Katabolitrepression. Der Austausch der Operatorsequenz (pMW720.1) hatte keinen signifikanten Effekt. Der Austausch der Sequenz zwischen -10- und -35-Region führte zu einer schwachen Abnahme der Gesamtaktivität. Im Gegensatz dazu führte der Austausch der 5′-UTR (pMW722.4) zu einer ähnlich hohen Aktivität, wie sie mit dem Kontrollvektor pSUN290 (P_{manP}) erreicht wurde. Der Basalspiegel war mit pMW722.4 allerdings ebenfalls erhöht und lag mehr als doppelt so hoch wie bei pSUN290.

3.2 Bestimmung der ManR-Bindestellen

Bereits zuvor wurde versucht, *manR* in *B. subtilis* 3NA (*spo0A3*) und TQ276 (*spo0A3* Δ*manR::ermC*) mithilfe der Konstrukte P_{manP}-*Strep-manR* sowie P_{manR}-*manR-Strep* zu überexprimieren (Sun, 2009). Dabei konnte ManR allerdings nicht in ausreichender Menge und aktiver Form produziert werden. In diesem Teil der Arbeit soll gezeigt werden, wie aktives ManR über zwei verschiedene Wege produziert und dessen spezifische Wechselwirkung mit der Promotor-DNA nachgewiesen werden konnte. Die Bindestellen von ManR wurden über DNase I Footprinting Experimente identifiziert. Durch Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und Dissoziationsrate k_{diss} wurde ManR genauer charakterisiert. Außerdem wurden Experimente mit Blick auf den Aktivierungsmechanismus von ManR durchgeführt.

3.2.1 Produktion von ManR in *B. subtilis* TQ356

Wie von anderen PRD-haltigen Aktivatoren bekannt ist, üben die zugehörigen PTS-Transporter einen negativen Regulationseffekt auf diese aus (Deutscher *et al.*, 2006). Auch beim Mannose System übt EII^{Man} einen negativen Regulationseffekt aus, da die Deletion von *manP* (EII^{Man}) im *B. subtilis* Stamm TQ356 (*spo0A3* Δ*manP::ermC*) sowohl mit pSUN290 (P_{manP}) als auch mit pSUN291 (P_{manR}) zu einem konstitutiven Expressionsverhalten führt (Sun und Altenbuchner, 2010). Der Regulator ManR schien in diesem Fall auch in Abwesenheit von Mannose eine aktive Form aufzuweisen. Auf Grundlage dieses Verhaltens wurde versucht, ManR mithilfe von *B. subtilis* TQ356 in aktiver Form zu produzieren.

Zunächst wurde *manR* aus *B. subtilis* 3NA über PCR amplifiziert (s6934/s6935) und auf Grundlage des pUB110-basierten Expressionsvektors pMW168.1 (Wenzel *et al.*, 2011) der P_{manP}-*manR*-Expressionsvektor pMW687.1 konstruiert (s. Anhang). Da die DNA-Bindedomäne am N-Terminus von ManR lokalisiert ist (s. Kapitel 1.4.2, Abbildung 1–6), wurde zunächst an den C-Terminus von ManR ein *Strep*- (pMW725.1) bzw. His_6-Affinitätstag (pMW735.3) angehängt, um die Bindung mit der DNA nicht zu beeinträchtigen. Die komplette Expressionskassette wurde über PmeI aus pMW687.1 entfernt, um den negativen Kontrollvektor pMW718.1 zu erhalten.

Kompetente *B. subtilis* TQ356 Zellen wurden daraufhin mit pMW687.1 (P_{manP}-*manR*), pMW725.1 (P_{manP}-*manR-Strep*), pMW735.3 (P_{manP}-*manR*-His_6) bzw. pMW718.1 (Negativkontrolle) transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agarnährböden mit Spectinomycin und zusätzlich 1 % (w/v) Glucose, um eine vorzeitige Expression von *manR* durch Katabolitrepression zu unterdrücken. Erfolgte die Selektion ohne Glucose, so zeigten die Transformanten später keine Überexpression mehr.

Die Expression von *manR* in *B. subtilis* TQ356 pMW687.1 wurde unter verschiedenen Inkubationszeiten und -temperaturen in LB-Medium ohne Glucose getestet. Über SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation für ca. 16 h bei 30 °C eine ausreichende, wenn auch geringe Menge an ManR in löslicher Form gebildet werden konnte (nicht gezeigt). Die Inkubation bei 37 °C führte vorwiegend zur Bildung von unlöslichen ManR-Agglomeraten (*Inclusion Bodies*). Bei niedrigeren Temperaturen reduzierte sich die ohnehin schon geringe Expression von *manR* noch weiter.

Die chromatographische Aufreinigung sowohl von ManR-*Strep* als auch von ManR-His_6 blieb wiederholt erfolglos. Ein spezifischer Nachweis von Proteinen mit *Strep*-Tag zeigte im Western Blot keine ManR-*Strep*-Bande (nicht gezeigt). Alternativ wurden die *Strep*- bzw. His_6-Affinitätstags an den N-Terminus von ManR gebracht (pMW760.3 bzw. pMW804.3). Eine Expression dieser Konstrukte in *B. subtilis* TQ356 blieb jedoch erfolglos.

3.2.2 Produktion von ManR in *E. coli* JM109

Da ManR in *B. subtilis* TQ356 zwar produziert, aber daraus nicht aufgereinigt werden konnte, wurde *manR-Strep* wie zuvor berichtet in *E. coli* JM109 pSUN246.1 überexprimiert und der Regulator anschließend aufgereinigt (Sun, 2009). Die Expression erfolgte allerdings für 4 h bei 30 °C. Für den Aufschluss und die Aufreinigung wurde außerdem auf Triton X-100 verzichtet, da dieses Detergens ManR zwar in eine lösliche, aber auch inaktive Form versetzt. Mit der Aufreingung von ManR-*Strep* aus insgesamt 30 OD_{600} Zellen wurde bei ca. 95 % Reinheit eine maximale Protein-Konzentration von ca. 0,15 mg ml^{-1} erreicht. Mittels Amicon Ultra-0,5 ml (30 K) Zentrifugationsfiltern (Merck Millipore, Darmstadt) konnte keine weitere Aufkonzentrierung von ManR erreicht werden.

3.2.3 In *B. subtilis* und *E. coli* produziertes ManR zeigt unterschiedliche DNA-Bindeaktivität

Für den Nachweis der spezifischen Wechselwirkung von ManR mit den Promotorregionen P_{manR} und P_{manP}, wurden diese zunächst über PCR amplifiziert und dabei jeweils der codierende und nicht-codierende Strang am 5′-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Dieselben Fragmente wurden zusätzlich mit unmarkierten Primern hergestellt. Tabelle 3–2 fasst die verwendeten Primerpaare zusammen.

Tabelle 3-2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für die Amplifikation und Markierung der P_{manR}- bzw. P_{manP}-Promotorregionen für den Gelmobilityshift Assay (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Die Position relativ zum Transkriptionsstart ist in Klammern angegeben.

Region	Codierender Strang		Nicht-codierender Strang	
	markiert	unmarkiert	markiert	unmarkiert
manR	Cy5-s7135 / s7136 (von -154 bis +1)	s7137 / s7136 (von -154 bis +1)	s7137 / Cy5-s5097 (von -154 bis +171)	s7137 / s8091 (von -154 bis +171)
manP	Cy5-s7232 / s7233 (von -165 bis -2)	s7234 / s7233 (von -165 bis -2)	s7234 / Cy5-s8001 (von -165 bis +44)	s7234 / s8002 (von -165 bis +44)

Zunächst wurden *B. subtilis* TQ356 pMW687.1 (*manR* chromosomal und auf Plasmid) bzw. *B. subtilis* TQ356 pMW718.1 (*manR* nur chromosomal) für 16 h bei 30 °C in LB-Medium angezogen und dabei die Expression von *manR* selbstinduziert. Für den Gelmobilityshift Assay wurden Rohextrakte hergestellt (lösliche Fraktion), und diese in verschiedenen Mengen eingesetzt (Abbildung 3–4). Während bei der Kontrolle (*B. subtilis* TQ356 pMW718.1) keine Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit der DNA (*Shift*) festgestellt werden konnte, zeigte sich diese jedoch mit zunehmender Menge an Rohextrakt mit überexprimiertem *manR* (*B. subtilis* TQ356 pMW687.1). Um unspezifische Wechselwirkungen von ManR mit der DNA auszuschließen, wurde jedem Ansatz Fischsperma-DNA in hoher Konzentration zugegeben. Die spezifische Bindung zeigte sich außerdem darin, dass sich bei Zugabe von unmarkiertem DNA-Fragment in 50× molarem Überschuss die Intensität der Bande mit gebundenem ManR um ein vielfaches reduzierte.

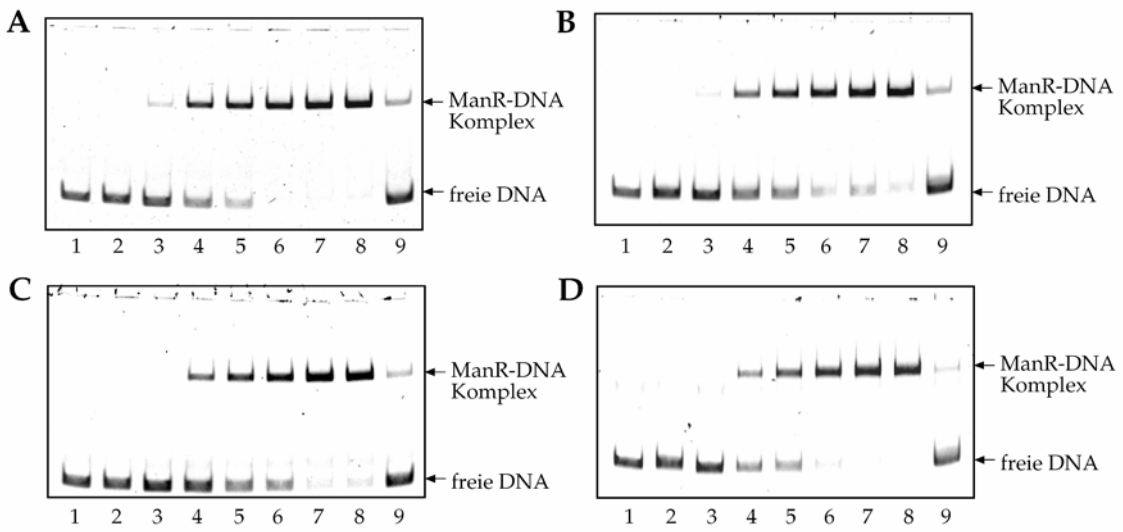


Abbildung 3-4: Nachweis der spezifischen Wechselwirkung von ManR mit den P_{manP}- bzw. P_{manR}-Promotorregionen (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Die codierenden bzw. nicht-codierenden Stränge von P_{manP} (**A** bzw. **B**) und P_{manR} (**C** bzw. **D**) wurden mit Cy5 markiert. Davon wurden jeweils 5 nM für den Gelmobilityshift Assay eingesetzt. Kontrolle: Cy5-DNA ohne Rohextrakt (Spur **1**) bzw. mit 7 µl Rohextrakt (ca. 1 mg ml^{-1} Gesamtprotein) von *B. subtilis* TQ356 pMW718.1 (Spur **2**; nur chromosomal induziertes *manR*). Die ManR-DNA-Wechselwirkung wurde in den Spuren **3-8** durch Zugabe von steigenden Mengen (0,5, 1, 2, 4, 6 und 7 µl) an Rohextrakt von *B. subtilis* TQ356 pMW687.1 (ca. 1 mg ml^{-1} Gesamtprotein; *manR* episomal und chromosomal induziert) nachgewiesen. Spur **9** zeigt das Verhalten bei Zugabe von 50× molarem Überschuss an unmarkiertem DNA-Fragment zusätzlich zu 7 µl Rohextrakt von *B. subtilis* TQ356 pMW687.1.

Bei Verwendung von aufgereinigtem *B. subtilis*-ManR-*Strep* aus *E. coli* JM109 pSUN246.1 zeigte sich allerdings ein völlig anderes Bild: Nur ein sehr geringer Anteil der markierten DNA zeigte eine Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit (s. Kapitel 3.2.4, Abbildung 3–5). Dies ließ darauf schließen, dass ManR hier nur zu einem geringen Teil in aktiver Form vorliegt und daher für weiterführende Experimente erst aktiviert werden muss.

3.2.4 Aktivierung von ManR

In Analogie zu anderen PRD-haltigen Regulatoren von *B. subtilis* wurde vermutet, dass die Aktivierung von ManR über die Phosphorylierung seiner PRD2 durch HPr-His-15~P erfolgt. Aus diesem Grund wurden die Gene von *B. subtilis* HPr (*ptsH*) und EI (*ptsI*) über PCR amplifiziert (s7654/s7655 bzw. s7656/s7657), in den Expressionsvektor pSUN390.1 mit Rhamnose-induzierbarem Promotor gebracht und dabei am 3′-Ende mit der Sequenz für den His_6-Affinitätstag versehen. Mithilfe der Vektoren pMW850.2 (*ptsH*) und pMW851.2 (*ptsI*) konnten HPr und EI in *E. coli* JM109 produziert werden (Plasmidkarten s. Anhang). Die aufgereinigten Proteine EI-His_6, HPr-His_6 und ManR-*Strep* wurden in unterschiedlicher Zusammensetzung zusammen mit PEP und Mg^{2+} für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend in einem Gelmobilityshift Assay eingesetzt (Abbildung 3–5). EI und HPr zeigten keinerlei Wechselwirkung mit der DNA (Spur 3 - 6). In Spur 2 ist nur ein geringer Anteil der markierten DNA durch ManR gebunden worden. Dies zeigt, dass mit *E. coli* JM109 produziertes ManR-*Strep* nur zu einem geringen Teil aktiv ist. Erst durch Inkubation mit PEP, EI und HPr zeigte sich bei der gesamten markierten DNA eine Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit (Spur 10). Interessanterweise verschwand die schwache DNA-Bande mit gebundenem ManR (Spur 7) bzw. wurde noch schwächer (Spur 9), sobald ManR-*Strep* mit HPr ohne PEP inkubiert wurde. Dies könnte auf eine Dephosphorylierung von ManR durch HPr hindeuten.

In vitro-aktiviertes ManR-*Strep* wurde daraufhin in steigender Konzentration mit Cy5-markierten P_{manR}- bzw. P_{manP}-DNA-Fragmenten (beide Stränge) gemischt und in einem Gelmobilityshift Assay eingesetzt (Abbildung 3–6). Dabei wurde in allen Fällen eine spezifische Bindung von ManR an die jeweilige Promotorregion nachgewiesen.

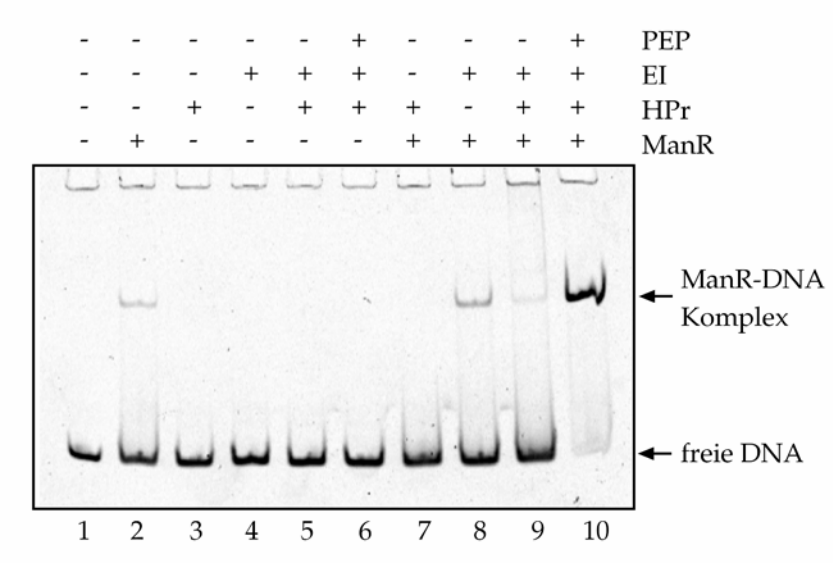


Abbildung 3-5: Gelmobilityshift Assay zur Überprüfung der *in vitro*-Aktivierung von ManR-*Strep* (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Eingesetzt wurden jeweils 3 nM Cy5-markiertes P_{manP}-Fragment, 186 nM ManR-*Strep*, 222 nM EI-His_6, 1,5 mM HPr-His_6 und 5 mM PEP. Spurbelegung: Spur **1**, -; Spur **2**, ManR; Spur **3**, HPr; Spur **4**, EI; Spur **5**, HPr + EI; Spur **6**, HPr + EI + PEP; Spur **7**, HPr + ManR; Spur **8**, EI + ManR; Spur **9**, HPr + EI + ManR; Spur **10**, HPr + EI + ManR + PEP.

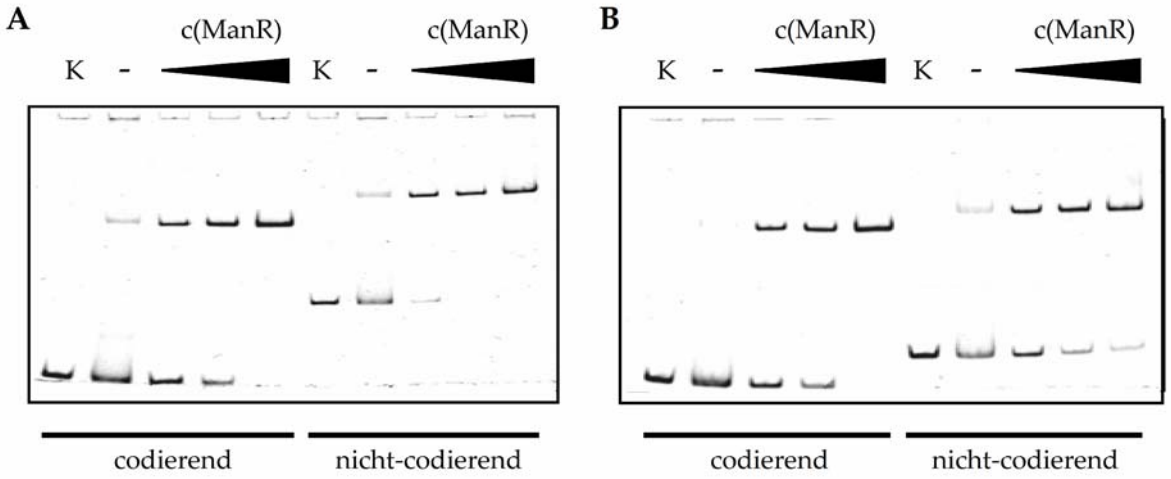


Abbildung 3-6: Gelmobilityshift Assay mit *in vitro*-aktiviertem ManR-*Strep*. Analysiert wurden die codierenden und nicht-codierenden Stränge der (**A**) P_{manR}- bzw. (**B**) P_{manP}-Promotorregion. In der ersten Spur (**K**) wurde reines Cy5-markiertes DNA-Fragment (5 nM) zur Kontrolle aufgetragen, gefolgt von einem Ansatz mit 193 nM nicht-aktiviertem ManR-*Strep* (**-**). In den drei folgenden Spuren wurden steigende Konzentrationen (33, 67 und 193 nM) von aktiviertem ManR-*Strep* eingesetzt.

3.2.5 Bestimmung der DNA-Bindeeigenschaften von ManR

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und die Dissoziationsrate k_{diss} von ManR in Bezug auf die Bindestellen in den Promotorregionen P_{manR} und P_{manP} wurden mittels Gelmobilityshift Experimenten bestimmt. K_D ist die Konzentration von ManR, die notwendig ist, um 50% der vorhandenen DNA zu binden. Die Dissoziationsrate k_{diss} stellt ein Maß für die Zeit dar, die benötigt wird, um das Dissoziationsgleichgewicht zu erreichen. Sie ist proportional zur Halbwertszeit des Protein-DNA-Komplexes.

Für diese Versuchsreihe wurde aus *E. coli* JM109 pSUN246.1 aufgereinigtes und aktiviertes ManR-*Strep* verwendet. Für die Aktivierung von ManR wurden die PTS-Komponenten EI, HPr und PEP im molaren Überschuss zugegeben. Dies sollte gewährleisten, dass alle ManR-Moleküle aktiviert werden können. Die Experimente wurden mehrfach unabhängig voneinander durchgeführt und die Mittelwerte bestimmt.

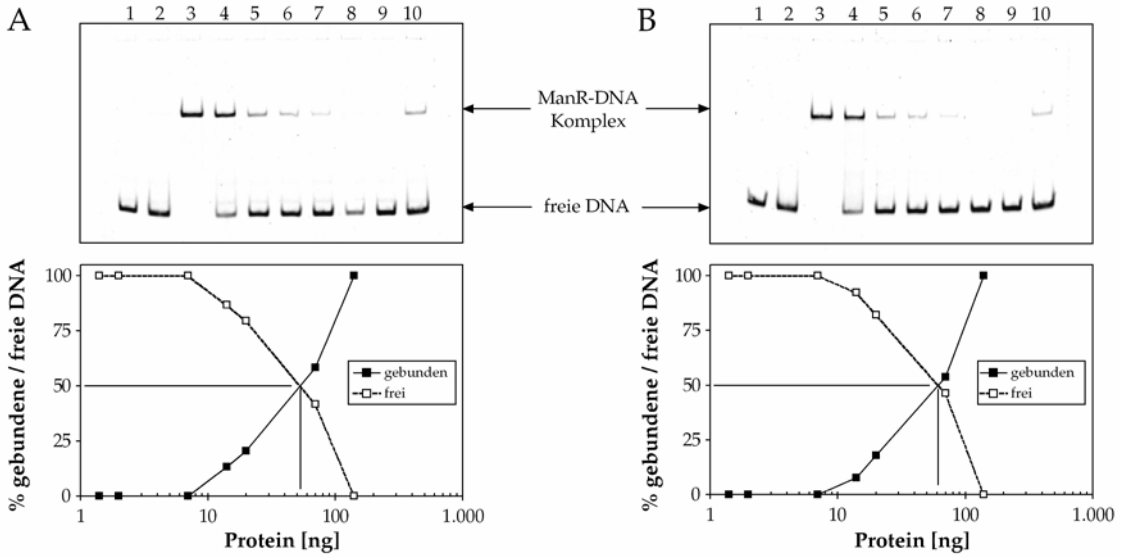


Abbildung 3-7: K_D-Bestimmung von ManR-*Strep* bzgl. der (A) P_{manR}- bzw. (B) P_{manP}-Promotorregion (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Jeweils 5 nM Cy5-markiertes DNA-Fragment sowie die folgenden Mengen an aktiviertem ManR-*Strep* wurden eingesetzt: 140 ng (186 nM; Spur **3**); 70 ng (93 nM; Spur **4**); 20 ng (26,5 nM; Spur **5**); 14 ng (18,6 nM; Spur **6**); 7 ng (9,3 nM; Spur **7**); 2 ng (2,7 nM; Spur **8**); 1.4 ng (1,9 nM; Spur **9**); 140 ng (186 nM) + 50× molarer Überschuss an unmarkiertem DNA-Fragment (Spur **10**). Als Kontrollen wurden reine Cy5-DNA (Spur **1**) sowie 140 ng (186 nM) inaktives ManR-*Strep* (mit HPr und EI, aber ohne PEP) eingesetzt (Spur **2**). Die Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit der ImageQuant Software.

Die Menge an ManR, die benötigt wurde um 50% der Cy5-markierten DNA mit der P_{manR}- bzw. P_{manP}-Promotorregion zu binden, betrug 51,7 ± 6,2 ng bzw. 56,7 ± 2,4 ng (Abbildung 3–7). Die entsprechenden K_D-Werte wurden zu 68,7 ± 8,2 nM bzw. 75,3 ± 3,2 nM berechnet. Für die Berechnung wurde von einem theoretischen Molekulargewicht von ca. 75.000 g mol^{-1} für ManR ausgegangen (Monomer).

Um die Dissoziationsrate k_{diss} und die korrespondierende Halbwertszeit zu bestimmen, wurde nach erfolgter Bildung des ManR-DNA-Komplexes unmarkiertes DNA-Fragment in 50× molarem Überschuss zugegeben (Abbildung 3–8). Die Berechnung von k_{diss} ergab für die P_{manR}-Region $(193 \pm 9{,}5) \times 10^{-6}\ s^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 59,9 ± 3 min, sowie für die P_{manR}-Region $(226 \pm 8{,}2) \times 10^{-6}\ s^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 51,3 ± 1,9 min.

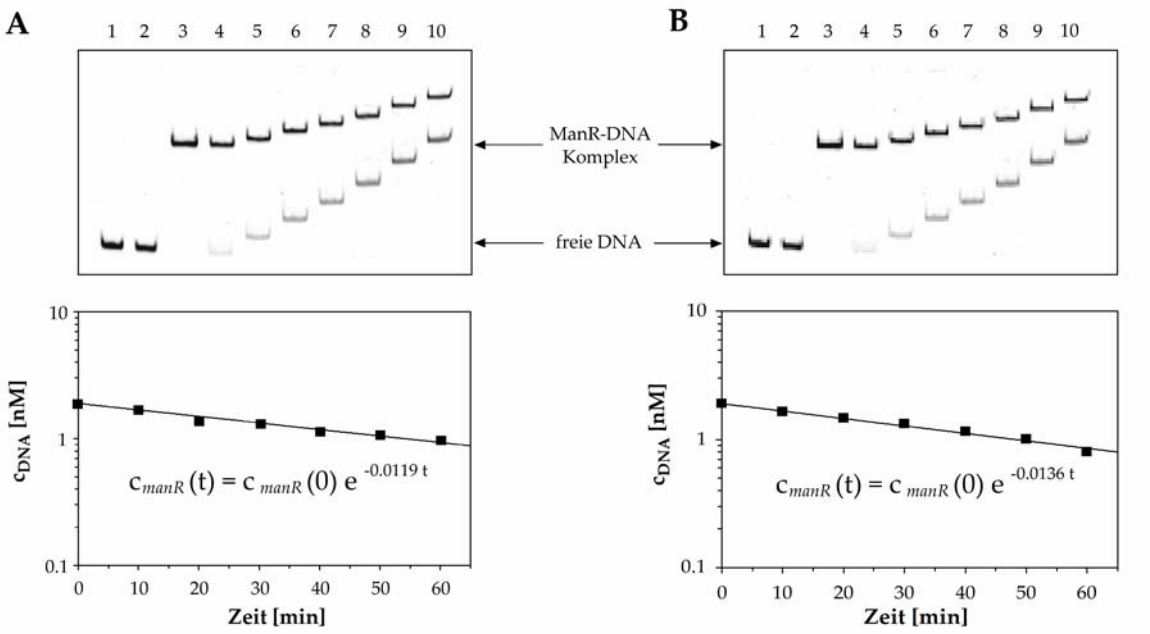


Abbildung 3-8: k_{diss}-Bestimmung von ManR-*Strep* bzgl. der (A) P_{manR}- bzw. (B) P_{manP}-Promotorregion (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Hierfür wurden jeweils 5 nM Cy5-markiertes DNA-Fragment sowie 140 ng (186 nM) aktiviertes ManR-*Strep* eingesetzt. Als Kontrollen wurden reine Cy5-DNA (Spur **1**) sowie 140 ng (186 nM) inaktives ManR-*Strep* (mit HPr und EI, aber ohne PEP) verwendet (Spur **2**). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50× molarem Überschuss an unmarkiertem DNA-Fragment gestartet und Proben vor der Zugabe (Spur **3**), nach 0 min (Spur **4**), 10 min (Spur **5**), 20 min (Spur **6**), 30 min (Spur **7**), 40 min (Spur **8**), 50 min (Spur **9**) and 60 min (Spur **10**) genommen und auf ein natives Polyacrylamidgel bei angelegter Spannung aufgetragen. Die Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit der ImageQuant Software.

Die Experimente wurden ebenfalls mit *B. subtilis* TQ356 pMW687.1 Rohextrakt durchgeführt. Die erhaltenen Bandenmuster waren zwar ähnlich (nicht gezeigt), eine quantitative Bestimmung von K_D und k_{diss} war aufgrund der nicht kalkulierbaren ManR-Konzentration jedoch nicht möglich.

3.2.6 DNase I Footprinting Experimente

Um die genaue Lage des Operators in den P_{manR}- und P_{manP}-Promotorregionen zu ermitteln, wurden DNase I Footprinting Experimente durchgeführt. Die DNA wird dabei in der Region mit gebundenem Protein vor einem Abbau durch die endonukleolytisch wirkende DNase I geschützt. Durch einen molaren Überschuss von ManR wurde gewährleistet, dass alle Cy5-markierten DNA-Fragmente gebunden werden konnten. Die Reaktionsbedingungen wurden außerdem so gewählt, dass die DNase I statistisch gesehen nur einmal schneiden sollte. Neben einer Sequenzierreaktion mit den jeweiligen Cy5-markierten Primern (s. Tabelle 3–2, Kapitel 3.2.3) wurden für die Footprinting Experimente inaktives (Negativkontrolle) sowie aktiviertes ManR-*Strep* eingesetzt (Abbildung 3–9).

DNase I Footprinting Experimente wurden außerdem mit Rohextrakt von *B. subtilis* TQ356 pMW687.1 Zellen durchgeführt, die zu einem ähnlichen Muster führten (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der DNase I Footprinting Experimente zeigt Tabelle 3–3.

Tabelle 3-3: Ergebnisse der DNase I Footprinting Experimente bzgl. der geschützten Regionen und hypersensitiven Stellen (HS) für die DNase I (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Die Ergebnisse mit aus *E. coli* JM109 pSUN246.1 aufgereinigtem und *in vitro* aktiviertem ManR-*Strep* sowie mit *B. subtilis* TQ356 pMW687.1 Rohextrakt mit aktivem ManR sind aufgelistet.

	P_{manR}-Promotorregion		**P_{manP}-Promotorregion**	
DNA-Strang	**geschützte Region**	**HS**	**geschützte Region**	**HS**
mit aufgereinigtem und aktiviertem ManR				
codierend	von -79 bis -49	keine	von -77 bis -26	-56
nicht-codierend	von -79 bis -31	-50	von -78 bis -29	-50
mit B. subtilis TQ356 pMW687.1 Rohextrakt inkl. aktivem ManR				
codierend	von -80 bis -50	keine	von -77 bis -29	-58
nicht-codierend	von -78 bis -30	-50	von -78 bis -30	-49

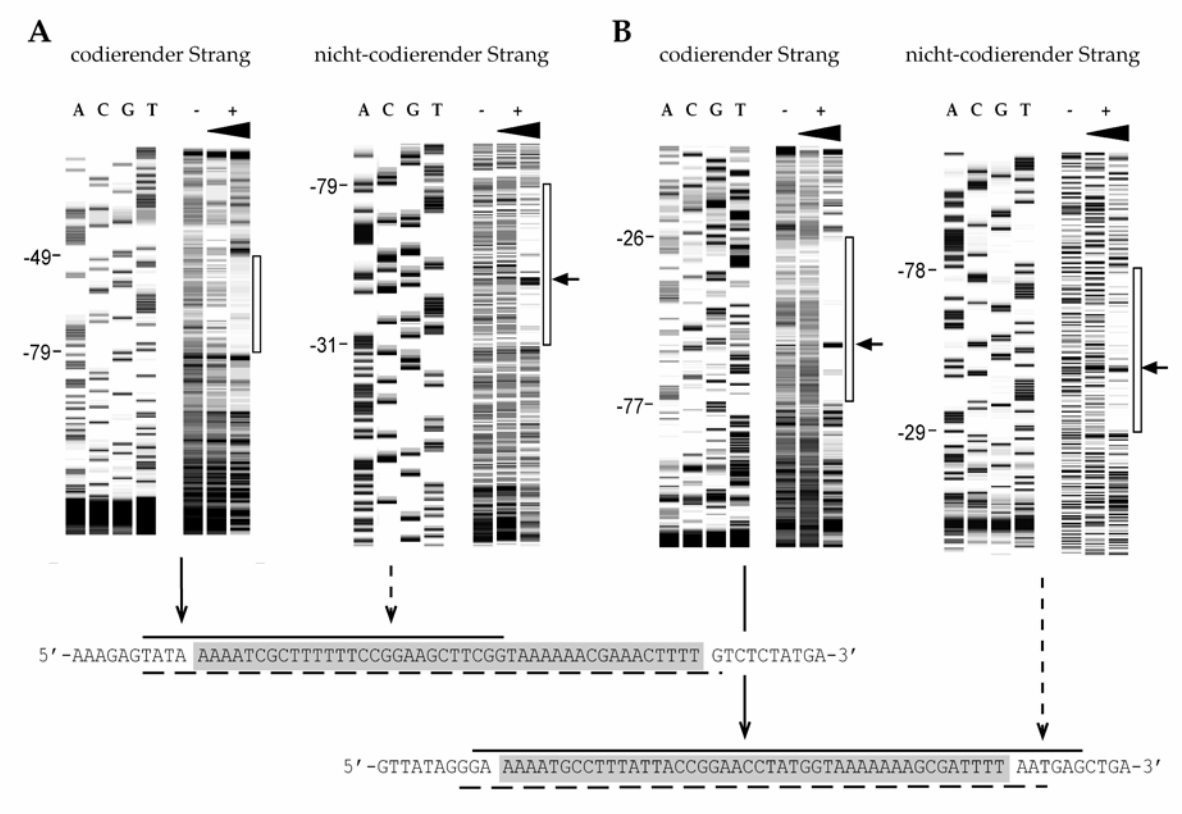


Abbildung 3-9: DNase I Footprinting Experiment nach der Bindung von ManR an die (A) P_{manR}- bzw. (B) P_{manP}-Promotorregionen (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Die Sequenzierreaktion (**A**, **C**, **G** und **T**) ist jeweils links der DNase I Footprinting Reaktion gezeigt, bei der ManR in seiner inaktiven (**-**; 0,5 mg) bzw. in seiner aktivierten Form (**+**; 0,1 mg und 0,5 mg) verwendet wurde. Die durch ManR vor dem DNase I-Abbau geschützten Regionen im codierenden sowie nicht-codierenden Strang sind durch einen Kasten rechts und Markierungen links der Reaktion gekennzeichnet. DNase I hypersensitive Stellen sind durch einen kleinen Pfeil markiert. Die geschützte Region des codierenden Strangs ist durch eine durchgezogene Linie oberhalb und die des nicht-codierenden Strangs durch eine gestrichelte Linie unterhalb der angegebenen Sequenz markiert. Die aufgrund der Sequenzanalysen postulierte Operatorsequenz ist grau hinterlegt.

Die postulierte Operatorsequenz (s. Kapitel 3.1.1, Abbildung 3–1) wurde von ManR in beiden Promotorregionen vor einem Abbau durch die DNase I geschützt. Allerdings wurde der Operator in der P_{manR}-Promotorregion nur auf dem nicht-codierenden Strang vollständig geschützt, während auf dem codierenden Strang nur die Hälfte geschützt war.

3.2.7 Künstlicher Hybridpromotor deutet auf Klasse II Aktivierung hin

Durch die DNase I Footprinting Experimente wurde die Lage des Operators in den jeweiligen Promotorregionen bestätigt. Die Überlappung der Operatoren mit den mutmaßlichen -35 Regionen deutet auf einen Aktivierungsmechanismus der Klasse II hin (Browning und Busby, 2004). Dies würde bedeuten, dass ManR mit der σ^A Untereinheit der RNA-Polymerase interagiert, um diese zu rekrutieren.

Durch die Positionierung des ManR Operators an eine entsprechende Stelle in einem Promotor der Klasse I (Interaktion des Regulators mit der α-C-Terminalen Domäne der RNA-Polymerase), sollte es möglich sein, diesen Promotor in einen der Klasse II umzuwandeln und nach Zugabe von Mannose induzieren zu können. Der Promotor P_{gutB} des *gutBP-ydjE* Operons (Abbau von Glucitol) ist ein Promotor der Klasse I, bei dem die Bindestelle des Regulators (GutR) stromaufwärts der -35 Region lokalisiert ist (Ye und Wong, 1994).

Um den Klasse II-Aktivierungsmechanismus von ManR zu überprüfen, wurde daher ein künstlicher Hybridpromoter aus ManR-Operator von P_{manP} (o) und dem *gutBP-ydjE* Operon Promotor P_{gutB} (p) konstruiert. Da der ManR-Operator in den P_{manR}- und P_{manP}-Regionen in etwa mit den mutmaßlichen -35 Promotorelementen endet (s. Abb. 3–1, Kapitel 3.1.1), wurde er direkt an den Beginn der Region zwischen -35 und -10 von P_{gutB} über *Overlap Extension*-PCR (s7646/s7647-s7648/s7649) fusioniert (Abbildung 3–10A). Der so konstruierte Hybrid-Promotor *manP*(o)-*gutB*(p) wurde anschließend vor *eGFP* kloniert (pMW833.1). Sowohl dieses Konstrukt als auch pMW168.1 (P_{manP}-*eGFP*) und pJOE4396.1 (P_{gutB}-*eGFP*) zur Kontrolle wurden in kompetente Zellen von *B. subtilis* 3NA gebracht (Abbildung 3–10A). Die Induktion der drei Stämme mit Mannose bzw. Glucitol zeigte, dass die Kontrollvektoren nur mit ihrem jeweiligen Induktor induziert werden konnten (Abbildung 3–10B). Das Hybridkonstrukt zeigte zwar schwächere Aktivitäten, ließ sich jedoch mit Mannose und nicht mit Glucitol induzieren.

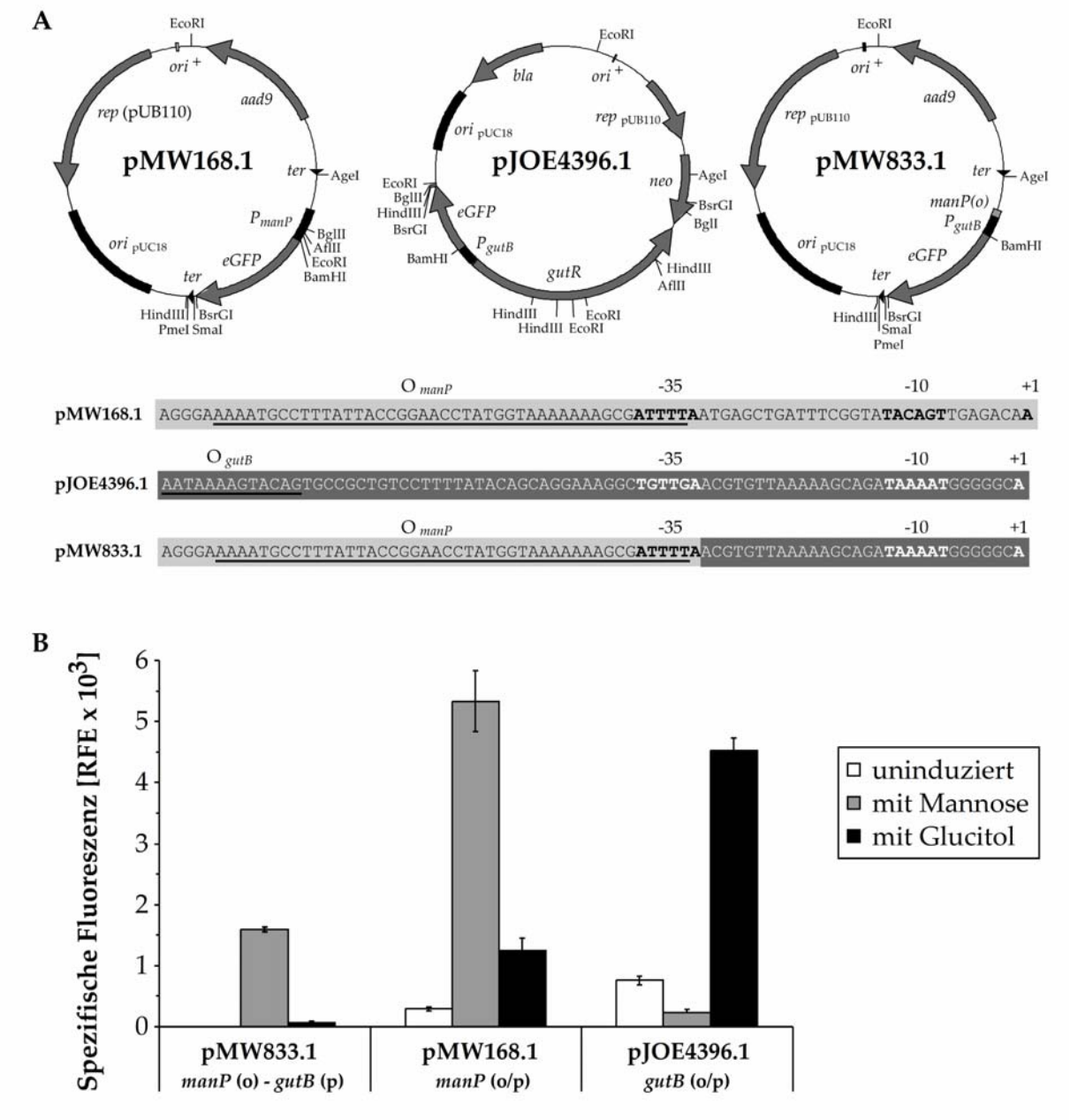


Abbildung 3-10: Hybridpromotor-Experiment zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von ManR. (**A**) Plasmidkarten und Promotorregionen der verwendeten *eGFP*-Expressionsvektoren pMW168.1 (o/p *manP*), pJOE4396.1 (o/p *gutB*) und pMW833.1 (o *manP*/p *gutB*). Transkriptionsstart und Promotorelemente sind fett gedruckt, die Operatorsequenzen sind unterstrichen (darstellungsbedingt O_{gutB} bei pJOE4396.1 nicht vollständig gezeigt). (**B**) Spezifische Fluoreszenz (100 µl Kultur mit 0,3 OD_{600} in relativen Fluoreszenzeinheiten [RFE]) nach 6 h Induktion. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

3.3 Mutagenese des Regulators ManR

In der UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank[7] wurden die Aminosäuren His-222, His-281 (beide PRD1), His-334, His-393 (beide PRD2) sowie Cys-415 ($EIIB^{Bgl}$) und His-570 ($EIIA^{Fru}$) als mögliche Phosphorylierungsstellen („*potential*" bzw. „*by similarity*") von ManR annotiert. Diese Angaben beruhen jedoch nicht auf einer experimentellen Grundlage, sondern auf Sequenz- und Strukturähnlichkeiten zu homologen Proteinen (Stülke *et al.*, 1998). Der Einfluss dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen wurde in diesem Teil der Arbeit durch Punktmutagenese genauer untersucht.

3.3.1 Alanin-Mutagenese der potentiellen Phosphorylierungsstellen

Um die genauen Vorgänge bei der Regulation des *man* Operons durch ManR besser verstehen zu können, wurden die potentiellen Phosphorylierungsstellen von ManR jeweils gegen Alanin ausgetauscht. Die *Codon Usage* Analyse von *manR* ergab 5′-GCA-3′ als das am häufigsten für Alanin verwendete Codon, welches daraufhin für die Mutagenese gewählt wurde. Die Mutagenese wurde mittels *Overlap Extension*-PCR und pMW376.8-DNA (*manR* Wildtyp) als Template durchgeführt. Über die natürlich vorkommenden Restriktionsschnittstellen BlpI, AgeI und MunI in *manR* konnten die mutierten Fragmente ohne zusätzliche Mutation in den Vektor pMW376.8 (s. Anhang) gebracht werden (Tabelle 3–4). Die Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt (s5155 bzw. s6157). Die PRD1-Doppelmutation wurde durch Insertion des H281A-Fragments in den H222A-Vektor pMW408.3 erhalten. Im Falle der PRD2-Doppelmutation wurden die Mutationen bei der Fusion-PCR unter Verwendung des H334A-Vektors pMW402.1 als Template eingefügt. Die EIIBA-Doppelmutation wurde durch Klonierung des H570A-Fragments aus pMW404.1 in den C415A-Vektor pMW403.1 erhalten.

[7] http://www.uniprot.org/uniprot/O31644

Tabelle 3-4: Konstruktionsschema für die Einführung der Ala-Mutationen in ManR. Für die PCR wurde pMW376.8-DNA bzw. pMW402.1-DNA(*) als Template verwendet. Für die Fusion-PCR wurden die äußeren Primer (unterstrichen) verwendet.

Mutation	Fusion-PCR (Insert)		über...	in...	*manR*-Vekt.
H222A (PRD1)	s6154/s6155	s6156/s6157	NdeI / AgeI	pMW376.8	pMW408.3
H281A (PRD1)	s6105/s6158	s6159/s6078	AgeI / MunI	pMW376.8	pMW401.1
H222A H281A (PRD1)	s6105/s6158	s6159/s6078	AgeI / MunI	pMW408.3	pMW436.1
H334A (PRD2)	s6105/s6160	s6161/s6078	AgeI / MunI	pMW376.8	pMW402.1
H393A (PRD2)	s6105/s6171	s6163/s6078	AgeI / MunI	pMW376.8	pMW407.1
H334A H393A (PRD2)	s6105/s6171*	s6163/s6078	AgeI / MunI	pMW376.8	pMW420.1
C415A (EIIB)	s6105/s6164	s6165/s6078	AgeI / MunI	pMW376.8	pMW403.1
H570A (EIIA)	s6165/s6166	s6167/s6168	MunI / BglII	pMW376.8	pMW404.1
C415A H570A (EIIBA)	pMW404.1		MunI / BglII	pMW403.1	pMW467.1

3.3.2 ManR-Alanin-Mutanten zeigen unterschiedliche Bindeaktivitäten

Um herauszufinden, inwiefern sich durch die Ala-Mutationen das Verhalten von ManR in Bezug auf die DNA-Bindung verändert, wurden die mutierten *manR*-Allele zunächst in den Expressionsvektor pMW725.1 gebracht und dabei mit einem C-terminalen *Strep*-Affinitätstag versehen. Anschließend wurden die Allele in den Rhamnose-Expressionsvektor pSUN246.1 kloniert (Plasmidkarte s. Anhang). Tabelle 3–5 zeigt das Konstruktionsschema.

Tabelle 3-5: Konstruktion der *manR*-Expressionsvektoren mit Ala-Mutation. Die mutierten *manR*-Allele wurden zunächst über NgoMIV / BstBI in pMW725.1 kloniert und dabei mit einem C-terminalen *Strep*-Affinitätstag versehen. Über BamHI / BstBI erfolgte eine weitere Klonierung in den Rhamnose-Expressionsvektor pSUN246.1.

Mutation	*manR*-Vektor	pMW725.1-Derivat	pSUN246.1-Derivat
H222A (PRD1)	pMW408.3	pMW978.1	pMW996.2
H281A (PRD1)	pMW401.1	pMW979.1	pMW997.1
H334A (PRD2)	pMW402.1	pMW980.2	pMW998.1
H393A (PRD2)	pMW407.1	pMW981.2	pMW999.1
C415A (EIIB)	pMW403.1	pMW982.6	pMW1000.1
H570A (EIIA)	pMW404.1	pMW983.1	pMW1001.4

Nach erfolgter Synthese der ManR-Ala-Muteine in *E. coli* JM109 wurden diese aufgereinigt, mithilfe von HPr, EI und PEP aktiviert und in einem Gelmobilityshift Assay eingesetzt (Abbildung 3–11). Die Mutanten ManR-C415A und ManR-H570A zeigten dabei ein ähnliches Verhalten wie ManR-Wildtyp: Ohne PEP zeigte nur ein kleiner Teil der markierten DNA eine verzögerte Wanderungsgeschwindigkeit, während mit PEP die gesamte DNA dieses Verhalten zeigte. Die Mutante ManR-H222A zeigte eine etwas schwächere, die ManR-H281A Mutante nur eine geringe Bindeaktivität. Bei den Varianten mit Mutation in der PRD2-Domäne, ManR-H334A und ManR-H393A, konnte keine Bindeaktivität mehr festgestellt werden.

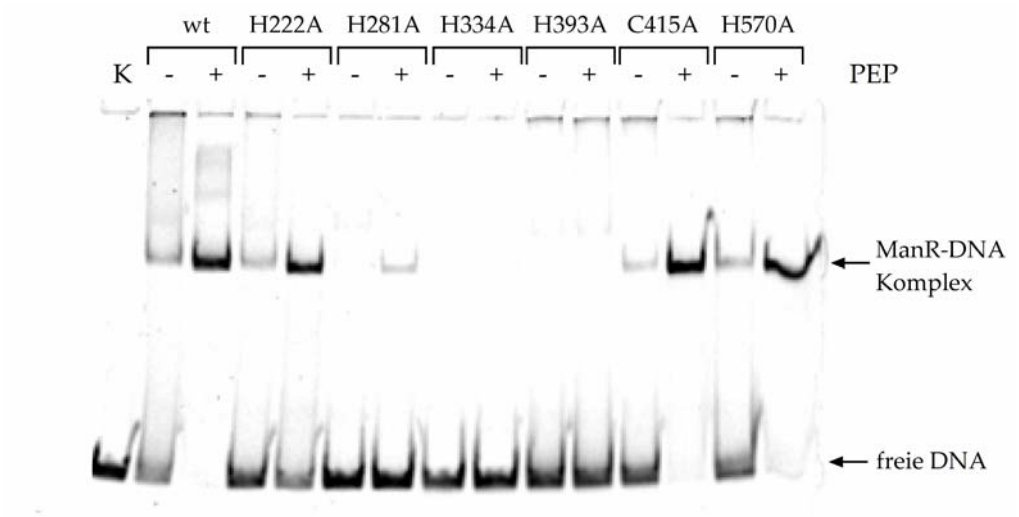


Abbildung 3-11: Gelmobilityshift Assay mit mutierten ManR-Molekülen (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Es wurden jeweils 3 nM Cy5-markiertes P_{manP}-DNA-Fragment sowie 186 nM aktiviertes ManR-*Strep* eingesetzt. Wildtyp (**wt**) und mutierte ManR-Moleküle wurden zuvor *in vitro* mithilfe von HPr und EI in Abwesenheit (**-**) und in Gegenwart (**+**) von PEP aktiviert. Als Kontrolle (**K**) wurde reines, Cy5-markiertes DNA-Fragment aufgetragen.

3.3.3 Konstruktion von *B. subtilis* Stämmen mit chromosomaler P_{manP}-*lacZ*-Expressionskassette und mutierten *manR*-Allelen

Um auch die Auswirkungen der Punktmutationen *in vivo* sehen zu können, wurde zunächst eine P_{manP}-*lacZ*-Expressionskassette unter Verwendung des pHM30/ pHM31-Systems (Motejadded und Altenbuchner, 2007) ins Chromosom von

B. subtilis TQ276 (*spo0A3* Δ*manR::ermC*) gebracht. Die Expressionskassette wurde über BamHI aus pSUN290 ausgeschnitten und in den BglII-linearisierten Vektor pMW523.1 (pHM31-Derivat mit intaktem *yvcA* Gen) eingefügt. Der erhaltene Vektor pMW678.6 (s. Anhang) wurde in natürlich kompetente Zellen von *B. subtilis* TQ276 pHM30 gebracht und dabei die P_{manP}-*lacZ*-Kassette unmittelbar stromabwärts des *hisI* Gens chromosomal integriert. Der erhaltene Stamm wurde als MW678 (*spo0A3* Δ*manR::ermC hisI*-P_{manP}-*lacZ*) bezeichnet.

Ursprünglich sollte das *manR* Wildtyp-Gen durch die jeweiligen *manR*-Allele einfach ausgetauscht werden. Das für die Integration notwendige Resistenzgen, welches unmittelbar stromaufwärts von *manR* integriert wurde, führte jedoch zu einer Beeinträchtigung der Genexpression. Aus diesem Grund wurden die mutierten *manR*-Allele unter Zuhilfenahme des Integrationsvektors pDG1730 in die *amyE* Region (α-Amylase) von *B. subtilis* MW678 chromosomal integriert (Tabelle 3–6).

Tabelle 3-6: Konstruktion der Stämme mit chromosomaler P_{manP}-*lacZ*-Kassette und mutierten *manR*-Genen in der *amyE*-Region. Über BamHI wurden die *manR*-Allele aus den *manR*-Vektoren in pDG1730 gebracht (Plasmidkarte von pMW871.1 im Anhang). wt = Wildtyp.

manR Mutation	*manR* Vektor	Integrationsvektor	Stamm
wt	pMW376.8	pMW871.1	MWZ 35
H222A (PRD1)	pMW408.3	pMW889.1	MWZ 37
H281A (PRD1)	pMW401.1	pMW897.1	MWZ 45
H222A H281A (PRD1)	pMW436.1	pMW906.1	MWZ 49
H334A (PRD2)	pMW402.1	pMW898.1	MWZ 46
H393A (PRD2)	pMW407.1	pMW895.11	MWZ 44
H334A H393A (PRD2)	pMW420.1	pMW900.1	MWZ 41
C415A (EIIB)	pMW403.1	pMW890.2	MWZ 38
H570A (EIIA)	pMW404.1	pMW902.1	MWZ 47
C415A H570A (EIIBA)	pMW467.1	pMW903.1	MWZ 48

Die erhaltenen Vektoren wurden daraufhin über natürliche Transformation in *B. subtilis* MW678 gebracht und dabei die *manR*-Allele in die *amyE*-Region chromosomal integriert (Abbildung 3–12).

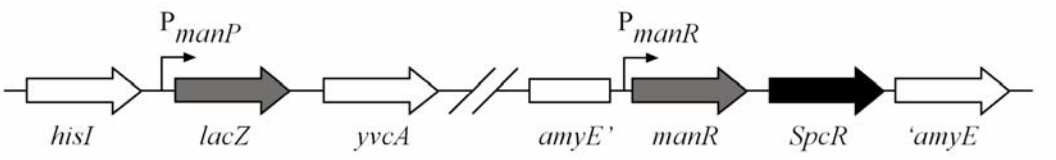


Abbildung 3-12: Lage der integrierten P_{manP}-*lacZ*- *und* P_{manR}-*manR*-Expressionskassetten im Genom der konstruierten *B. subtilis* Mutanten. SpcR = Spectinomycin-Resistenzgen *aad9.*

Nach erfolgter Selektion auf LB_{Sp} erfolgte ein Screening auf $LB_{Stärke}$-Platten, um Rekombinationsereignisse durch Single-Crossover auszuschließen. Nach Zugabe von Lugol'scher Lösung (Iod-Kaliumiodid-Lösung) konnten die Klone mit disruptiertem *amyE* Gen identifiziert werden. Jeweils drei dieser Klone wurden unabhängig voneinander für einen β-Galaktosidase-Aktivitätstest herangezogen. Die Aktivitäten wurden unter nicht-induzierenden Bedingungen (Basalexpression), nach Induktion mit Mannose und bei Katabolitrepression (Mannose und Glucose) gemessen (Abbildung 3–13).

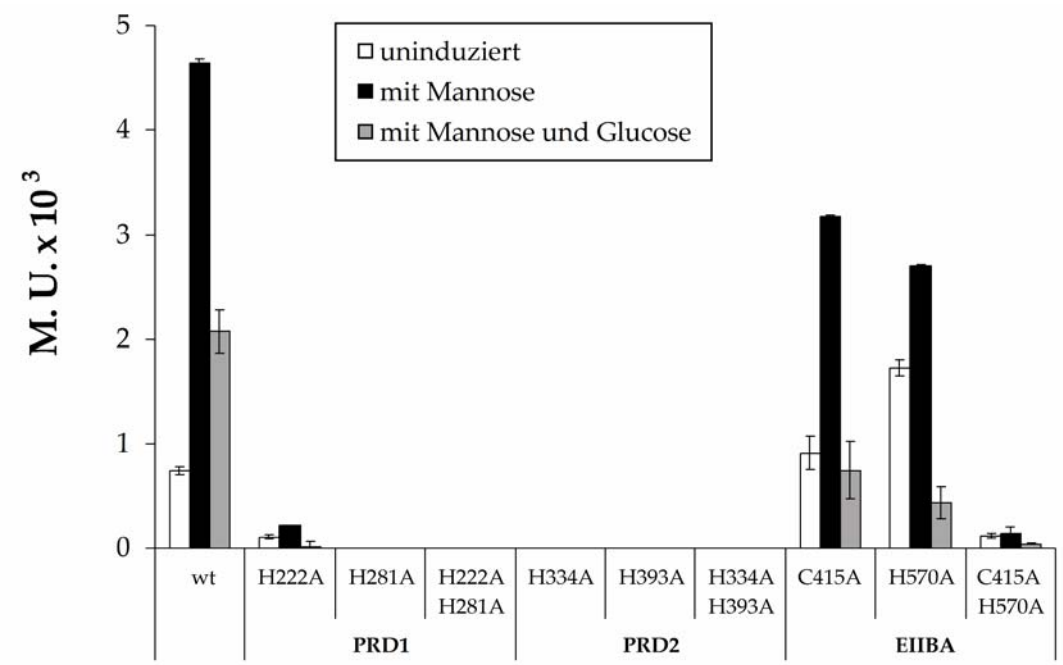


Abbildung 3-13: β-Galaktosidase-Aktivitätstest mit *B. subtilis* Stämmen mit chromosomaler P_{manP}-*lacZ*-Expressionskassette und verschiedenen, im *amyE*-Lokus integrierten *manR*-Allelen (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Die Basalexpression (uninduziert) sowie die Aktivitäten (in Miller Units, M.U.) bei Induktion (0,2% (w/v) Mannose) und bei Katabolitrepression (je 0,2% (w/v) Mannose und Glucose) aus drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte aufgetragen. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Die β-Galaktosidase-Aktivitäten der ManR-C415A-Mutante ähnelten der des Wildtyps, wobei die Katabolitrepression durch Glucose stärker ausgeprägt war. Die Basalexpression der ManR-H570A-Mutante erreichte fast 65 % der Expression unter induzierenden Bedingungen und war damit im Vergleich zum Wildtyp mit ca. 16 % deutlich erhöht. Die ManR-C415A/H570A-Doppelmutante zeigte zwar kaum Aktivität, jedoch war auch hier ein konstitutiver Phänotyp erkennbar, der sich durch eine Basalexpression von ca. 82 % der Expression unter induzierenden Bedingungen auszeichnete. Bei den PRD-Mutanten zeigte nur ManR-H222A eine geringe Aktivität.

3.3.4 Konstruktion von *manR*-Expressionsvektoren

Da ManR auch die Expression seines eigenen Gens positiv beeinflusst (Sun und Altenbuchner, 2010), könnten Mutationen des Regulators auch dessen intrazellulären Level reduzieren und damit auch die *lac*Z-Expression negativ beeinflussen. Zum Ausgleich wurden daher pBS72-basierte Expressionsvektoren (Titok *et al.*, 2003) mit geringer Kopienzahl (ca. 5-6 pro Chromosom) auf der Basis von pSUN290 konstruiert (Tabelle 3–7).

Tabelle 3-7: Konstruktion der *manR*-Expressionsvektoren: Aus den *manR*-Vektoren wurden die *manR*-Allele zusammen mit ihrem eigenen Promotor über BamHI in den Expressionsvektor pSUN290 (pBS72-Derivat) gebracht und dabei die P_{manP}-*lac*Z-Expressionskassette ersetzt (Plasmidkarte von pMW661.1 im Anhang).

manR Mutation	*manR*-Vektor	Expressionsvektor
wt	pMW376.8	pMW661.1
H222A (PRD1)	pMW408.3	pMW668.3
H281A (PRD1)	pMW401.1	pMW663.1
H222A H281A (PRD1)	pMW436.1	pMW670.1
H334A (PRD2)	pMW402.1	pMW664.1
H393A (PRD2)	pMW407.1	pMW667.3
H334A H393A (PRD2)	pMW420.1	pMW669.1
C415A (EIIB)	pMW403.1	pMW665.1
H570A (EIIA)	pMW404.1	pMW666.1
C415A H570A (EIIBA)	pMW467.1	pMW671.2

Die *manR*-Expressionsvektoren wurden in *B. subtilis* MW678 gebracht. Von jeweils drei Transformanten wurde die β-Galaktosidase-Aktivität unter nicht-induzierenden Bedingungen (Basalexpression), nach Induktion mit Mannose und bei Katabolitrepression (Mannose und Glucose) gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3–14 dargestellt.

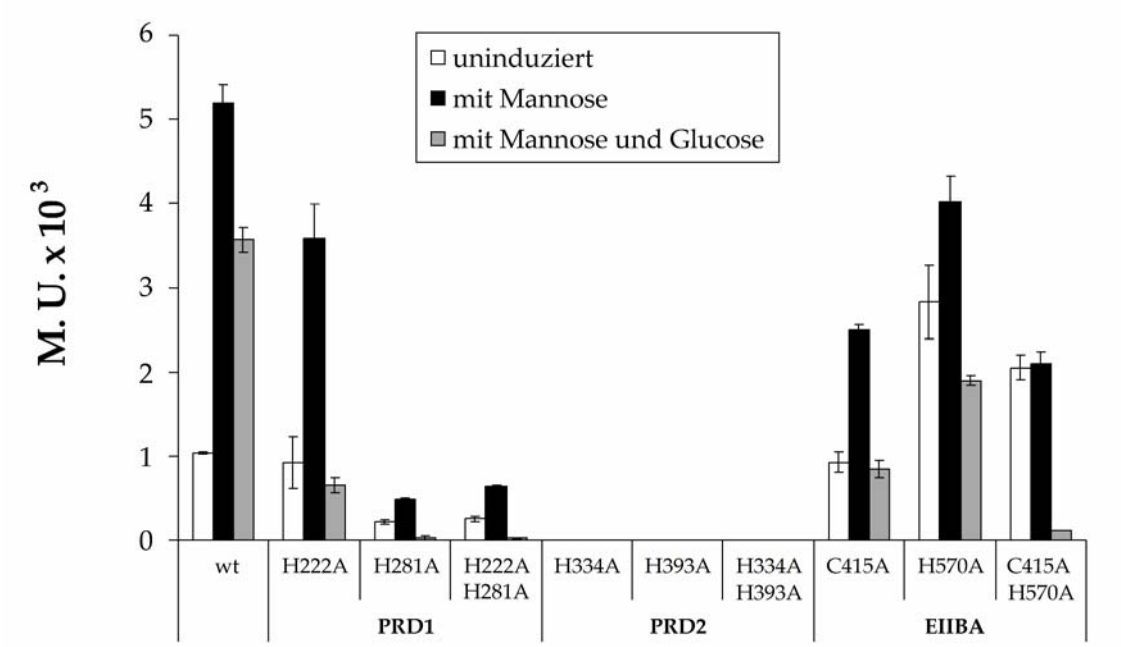


Abbildung 3-14: β-Galaktosidase-Aktivitätstest mit *B. subtilis* MW678 Stämmen (chromosomale P_{manP}-*lacZ*-Expressionskassette) mit *manR*-Expressionsvektoren (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). Die Basalexpression (uninduziert) sowie die Aktivitäten (in Miller Units, M.U.) bei Induktion (0,2% (w/v) Mannose) und bei Katabolitrepression (je 0,2% (w/v) Mannose und Glucose) aus drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte aufgetragen. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Die episomale Expression von *manR* führte im Fall von ManR-wt zu ähnlich hohen Aktivitäten wie bei chromosomaler *manR* Expression, wobei die Katabolitrepression um fast 75% geringer ausfiel. Auch die Aktivitäten mit ManR-C415A waren ähnlich hoch. Jedoch zeigten die PRD1-Mutanten deutlich höhere Aktivitäten, v.a. ManR-H222A. Die PRD2-Mutanten wiesen auch in diesem Fall keine Aktivität auf. Die ManR-H570A- und die ManR-C415A/H570A-Mutante zeigten beide konstitutives Verhalten. Die Basalaktivitäten erreichten 70 bzw. 97% im Vergleich zur Expression unter induzierenden Bedingungen.

3.3.5 Phosphomimikry durch Asp-Mutagenese

Der Austausch der potentiellen Phosphorylierungsstellen des PRD-haltigen Regulators MtlR aus *B. subtilis* gegen die negativ geladene Aminosäure Aspartat imitierte den phosphorylierten Zustand des Regulators (Joyet *et al.*, 2010). Diese Phosphomimikry sollte auch für ManR durchgeführt werden. Analog zur Konstruktion der Ala-Mutanten wurden die entsprechenden Asp-Mutanten konstruiert (Tabelle 3–8).

Tabelle 3-8: Einführung der Asp-Mutationen in *manR* – Konstruktion der Expressions- und Integrationsvektoren: Die fusionierten PCR-Produkte wurden über die angegebenen Schnittstellen direkt in den Expressionsvektor pMW661.1 bzw. den Integrationsvektor pMW871.1 gebracht. Die erhaltenen Vektoren wurden durch Sequenzierung überprüft (s6078, s6078, s6105 bzw. s6157). Die Asp-Doppelmutanten wurden ebenfalls analog zu den Ala-Doppelmutanten konstruiert.

Mutation	Primerpaare (a/b → c/d)		Schnittstellen	Expr.Vektor	Int.Vektor	Stamm
H222D (PRD1)	s7821/s7806	s7807/s7822	BlpI	pMW1007.1	pMW969.2	MWZ 68
H281D (PRD1)	s6105/s7808	s7809/s6078	AgeI / MunI	pMW1012.2	pMW927.1	MWZ 58
H222D H281D (PRD1)	-		-	pMW1043.1	pMW976.1	MWZ 69
H334D (PRD2)	s6105/s7492	s7493/s6078	AgeI / MunI	pMW812.1	pMW912.1	MWZ 52
H393D (PRD2)	s6105/s6776	s6777/s6078	AgeI / MunI	pMW672.5	pMW899.1	MWZ 40
H334D H393D (PRD2)	-		-	pMW662.6	pMW901.1	MWZ 42
C415D (EIIB)	s6105/s7664	s7665/s6078	AgeI / MunI	pMW1020.1	pMW891.2	MWZ 39
H570D (EIIA)	s6165/s7662	s7663/s6168	MunI / BglII	pMW1021.5	pMW904.1	MWZ 43
C415D H570D (EIIBA)	-		-	pMW1022.1	pMW910.1	MWZ 50

Die Expressions- bzw. Integrationsvektoren wurden in *B. subtilis* MW678 (*spo0A3* Δ*manR*::*ermC hisI*-P_{manP}-*lacZ*) gebracht. Mit jeweils drei der richtigen Transformanten wurde ein β-Galaktosidase-Aktivitätstest durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3–15 dargestellt.

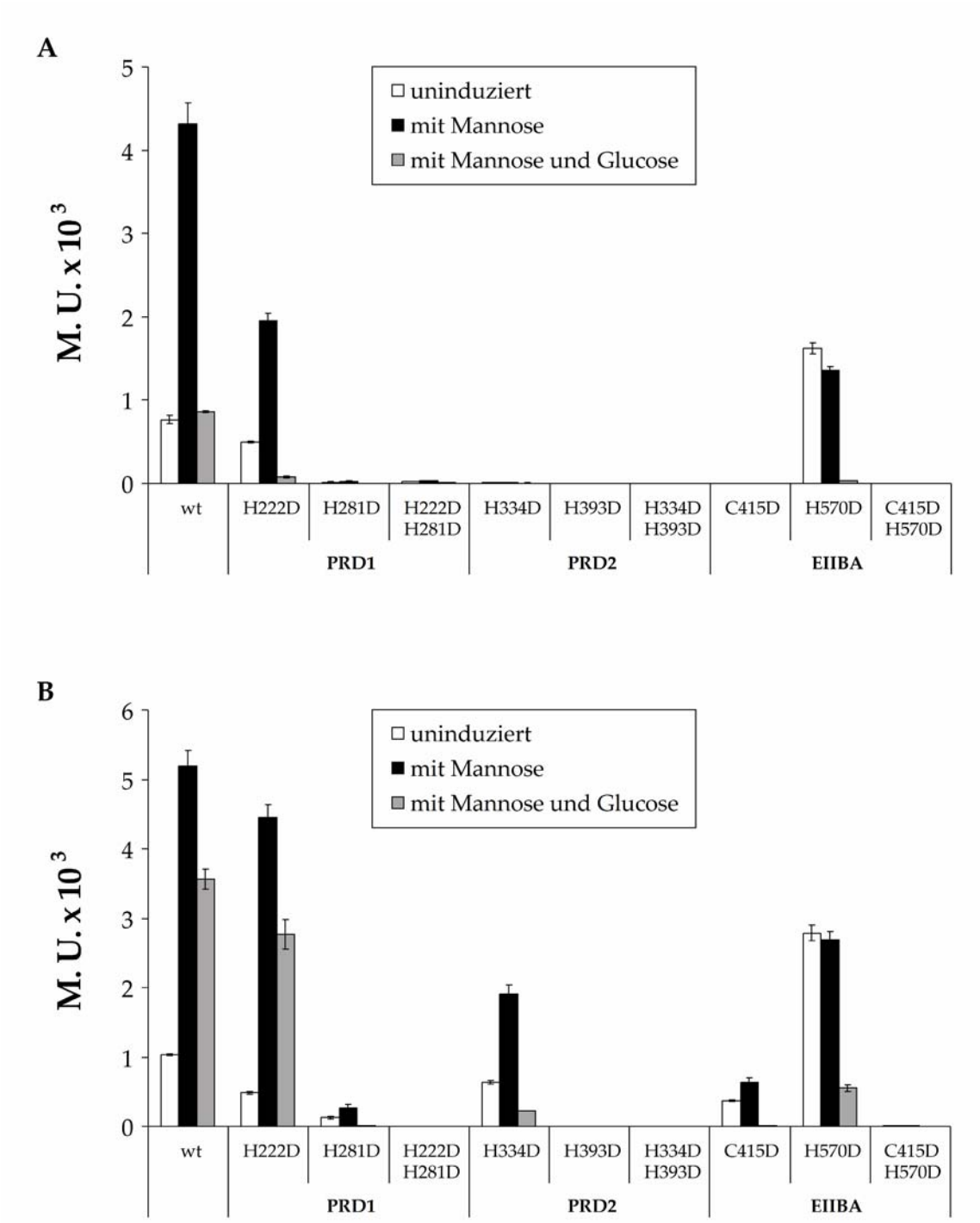


Abbildung 3-15: β-Galaktosidase-Aktivitätstest mit verschiedenen ManR-Asp-Mutanten. (**A**) *B. subtilis* Stämme mit chromosomaler P_{manP}-*lacZ*-Expressionskassette und verschiedenen, im *amyE*-Lokus integrierten *manR*-Allelen. (**B**) *B. subtilis* MW678 Stämme (chromosomale P_{manP}-*lacZ*-Expressionskassette) mit *manR*-Expressionsvektoren. Die Basalexpression (uninduziert) sowie die Aktivitäten (in Miller Units, M.U.) bei Induktion (0,2% (w/v) Mannose) und bei Katabolitrepression (je 0,2% (w/v) Mannose und Glucose) aus drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte aufgetragen. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Die Verwendung der Asp-Mutanten führte zu ähnlichen Resultaten wie mit den Ala-Mutanten. Auch hier brachte die ManR-H222D-Mutation die höchste Aktivität unter den PRD-Mutanten hervor. Aber auch die ManR-H334D-Mutante zeigte, zumindest bei episomaler Expression, eine Aktivität. Diese beiden PRD-Mutanten waren jedoch beide noch induzierbar und nicht konstitutiv. Die anderen PRD-Mutanten, sowie die ManR-C415D- und ManR-C415D/H570D-Mutanten wiesen keine bzw. kaum Aktivität auf. Wie bereits ManR-H570A zeigte auch ManR-H570D ein konstitutives Verhalten. Der Basallevel lag in diesem Fall knapp über 100 % der Aktivität unter induzierten Bedingungen.

3.3.6 Deletion der EIIB^{Bgl}- und EIIA^{Fru}-Domänen von ManR

Die Mutation der potentiellen Phosphorylierungsstellen der EIIB^{Bgl}- und EIIA^{Fru}-Domänen führte zu einer konstitutiven Expression des *lac*Z Gens unter Kontrolle des Promotors P_{manP}. Geht man in Analogie zu anderen PRD-Aktivatoren von einer Inaktivierung von ManR durch Phosphorylierung dieser Domänen aus, so müsste auch die Deletion dieser Domänen einen konstitutiven Phänotyp hervorbringen. Aus diesem Grund sollten beide Domänen ab der 401. Aminosäure sowie nur die EIIA^{Fru}-Domäne ab der 496. Aminosäure deletiert werden.

Die Deletionen erfolgten über PCR-Amplifikation von *manR* ohne die entsprechenden Sequenzen. Unter Verwendung der Primerpaare s6105/s7827 bzw. s6105/s7828 entstanden die um die EIIBA- bzw. EIIA-Domänen verkürzten *manR*-Allele, die in den *amyE*-Integrationsvektor pMW871.1 über AgeI / BglII gebracht wurden (pMW933.1 bzw. pMW934.1). Kompetente Zellen von *B. subtilis* MW678 wurden mit diesen Integrationsvektoren transformiert. Mit jeweils drei Klonen der erhaltenen *B. subtilis* Stämme MWZ 54 (ΔEIIBA / $ManR_{400}$) bzw. MWZ 55 (ΔEIIA^{Fru} / $ManR_{495}$) wurden β-Galaktosidase-Aktivitätstests durchgeführt (Abbildung 3–16). Als Kontrolle wurde *B. subtilis* MWZ 35 (ManR-wt) verwendet.

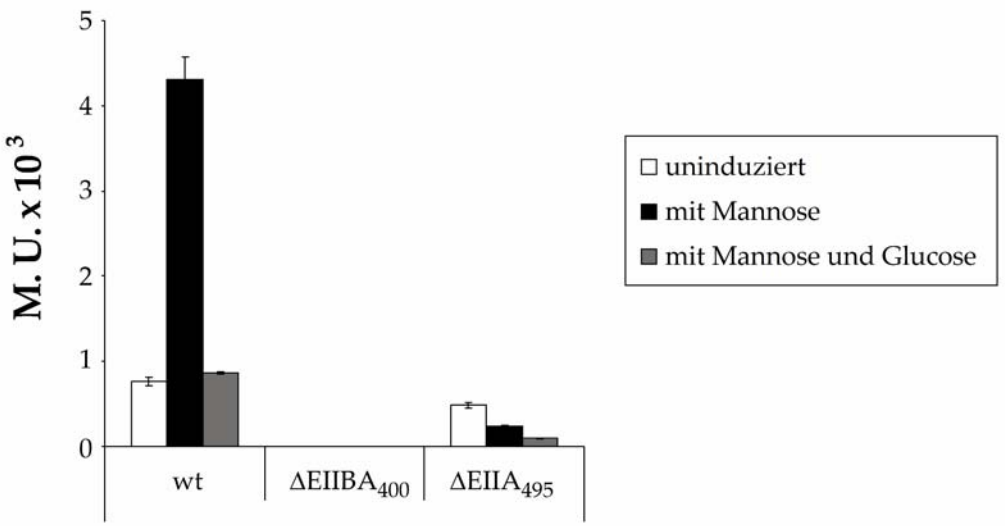


Abbildung 3-16: Einfluss der Deletion der EIIB- und EIIA-Domänen von ManR. Getestet wurden die *B. subtilis* Stämme MWZ 35 (wt), MWZ 54 ($\Delta EIIBA_{400}$) und MWZ 55 ($\Delta EIIA_{495}$) in einem β-Galaktosidase-Aktivitätstest unter nicht-induzierenden Bedingungen, nach Induktion (0,2% (w/v) Mannose) und bei Katabolitrepression (je 0,2% (w/v) Mannose und Glucose). Angegeben sind die Mittelwerte der Aktivitäten (in Miller Units, M.U.) aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Während die Deletion beider Domänen ($ManR_{400}$) in einem totalen Verlust der β-Galaktosidase-Aktivität resultierte, zeigte $ManR_{495}$ ($\Delta EIIA^{Fru}$-Mutante) noch eine schwache, jedoch konstitutive Aktivität. Interessanterweise lag der Basallevel mit 483 M.U. fast doppelt so hoch wie die Aktivität unter induzierten Bedingungen (243 M.U.). Diese reduzierte sich auf ca. 93 M.U. nach Zugabe von Glucose.

3.3.7 Inhibierung der ManR Aktivität durch EII^{Man}

Die Deletion des Gens *manP* für den PTS-Transporter EII^{Man} führte zu einer konstitutiven Expression sowohl mit P_{manR} als auch mit P_{manP} (Sun und Altenbuchner, 2010). Es wird vermutet, dass EII^{Man} Phosphorylgruppen auf die $EIIA^{Fru}$- bzw. $EIIB^{Bgl}$-Domänen von ManR überträgt und den Regulator dadurch inaktiviert. Inwiefern diese Hypothese zutreffend ist, sollte in diesem Teil der Arbeit herausgefunden werden.

Dazu wurde zunächst die Domänenstruktur des 650 Aminosäuren umfassenden Transporters EII^{Man} genauer analysiert (Abbildung 3–17), wobei die Einträge unter der Accession Number O31645 in der Uniprot-Datenbank[8] berücksichtigt wurden. Die Struktur gliedert sich in eine EIIB- gefolgt von einer EIIC- und EIIA-Domäne. In der Transmembrandomäne EIIC konnte eine modifizierte Aminosäure, nämlich eine phosphorylierte Serylgruppe an Position 365 identifiziert werden (Macek *et al.*, 2007). Ein Cystein an Position 9 in der EIIB-Domäne sowie ein Histidin an Position 566 in der EIIA-Domäne wurden aufgrund von Ähnlichkeiten zu anderen Mitgliedern derselben Proteinfamilie als potentielle Aminosäuren für den Phosphorylgruppentransfer deklariert („*active sites*").

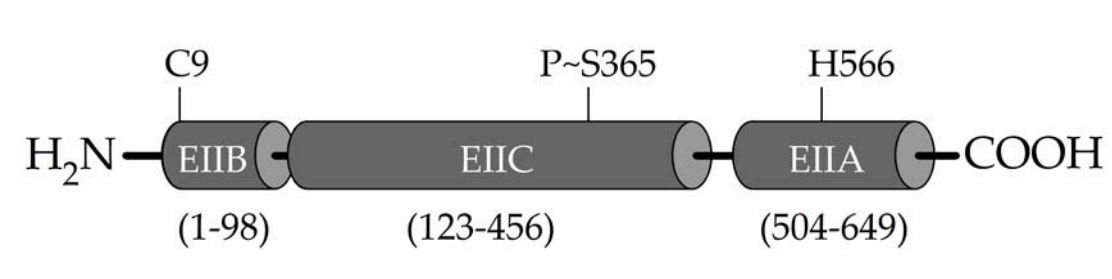


Abbildung 3-17: Domänenstruktur des Mannose-PTS-Transporters EII^{Man}. Die Position der einzelnen Domänen, die Lage der modifizierten Aminosäure P~S365 und die der beiden potentiellen Aminosäuren C9 und H566 für den Phosphorylgruppentransfer sind gekennzeichnet.

EII^{Man} wäre als Membranprotein nur schwer zu exprimieren und in löslicher Form zu gewinnen. Um zu überprüfen, ob eine Phosphorylgruppenübertragung von dessen EIIB- und EIIA-Domänen auf die entprechenden Aminosäuren der $EIIB^{Bgl}$- (C415) und $EIIA^{Fru}$-ähnlichen Domänen (H570) von ManR stattfindet, sollten daher nur die an der Phosphorylgruppenübertragung beteiligten, intrazellulären EIIB- und EIIA-Domänen von EII^{Man} separat produziert werden: Über PCR wurden die Sequenzen für die Aminosäuren 1-120 entsprechend für $EIIB^{Man}$ sowie 438-650 für $EIIA^{Man}$ amplifiziert (s7658/s7659 bzw. s7660/s8043), in einen Rhamnose-induzierbaren Expressionsvektor (pSUN390.1) gebracht und dabei mit einem C-terminalen His_6-

[8] http://www.uniprot.org/uniprot/O31645

Affinitätstag versehen. Mit den entsprechenden Vektoren wurden EIIB^{Man}-His$_6$ (pMW852.1) und EIIA^{Man}-His$_6$ (pMW987.6) in *E. coli* JM109 produziert und anschließend aufgereinigt (Plasmidkarten s. Anhang). Zusammen mit den PTS-Komponenten HPr, EI und PEP wurden ManR-wt bzw. die ManR-Mutanten ManR-C415A und ManR-H570A einer *in vitro* Aktivierung mit anschließender Überprüfung ihrer Bindungseigenschaften an den Operator (Gelmobilityshift Assay) unterzogen (Abbildung 3–18A).

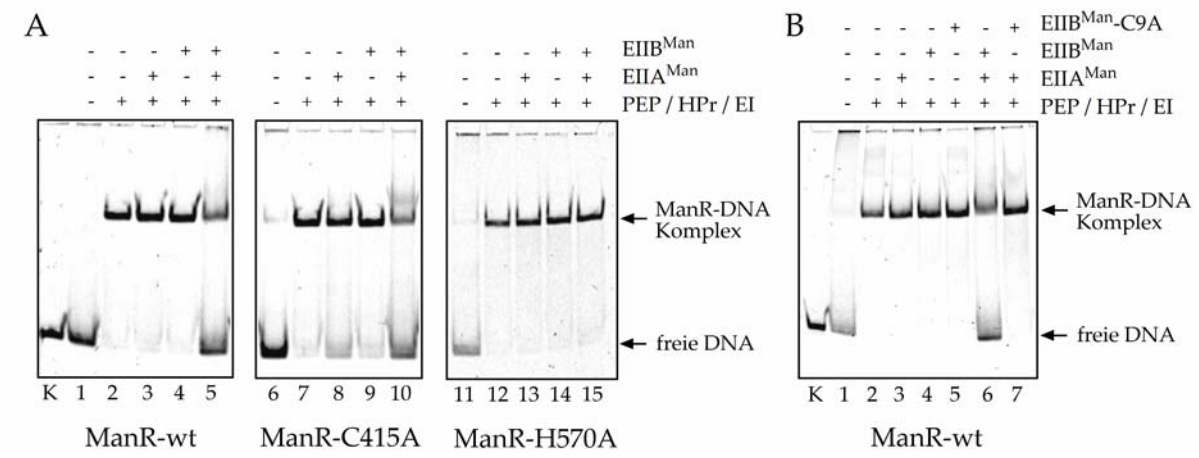


Abbildung 3-18: Einfluss von (A) EIIB^{Man} und EIIA^{Man} auf die DNA-Bindeaktivität von ManR und (B) von der potentiellen Phosphorylierungsstelle Cys-9 von EIIB^{Man} (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). *In vitro* Aktivierung: 266 nM der ManR Proteine (wt, C415A und H570A) wurden mit 317 nM EI, 1.5 µM HPr, 5 mM PEP, 1.5 µM EIIB^{Man}(-C9A), und 848 nM EIIA^{Man} in der Zusammenstellung wie über den Gelbildern angegeben inkubiert. Die Gelmobilityshift Assays wurden mit 3 nM Cy5-markiertem P$_{manP}$-Fragment, welches in Spur **K** als Kontrolle separat aufgetragen wurde, durchgeführt.

Unter Zugabe von sowohl EIIB^{Man} als auch EIIA^{Man} verschlechterte sich die Bindungsaktivität von ManR-wt sowie ManR-C415A. Bei der ManR-H570A-Mutante wurde hingegen keine Änderung der Bindungseigenschaften festgestellt. Die separate Zugabe von EIIB^{Man} bzw. EIIA^{Man} führte ebenso zu keiner Änderung. Damit konnte bestätigt werden, dass EII^{Man} einen negativen Regulationseinfluss auf den Regulator ManR ausübt und dabei hauptsächlich dessen EIIA^{Fru}-Domäne eine Rolle spielt.

Um zu zeigen, dass der negative Regulationseffekt auf eine vermutliche Phosphorylgruppenübertragung über den Cysteinrest an Position 9 von $EIIB^{Man}$ erfolgen könnte, wurde C9 gegen Alanin ausgetauscht. Mithilfe einer *Overlap Extension*-PCR wurde die Mutation eingeführt und der Rhamnose-Expressionsvektor pMW1034.7 konstruiert, mit dem $EIIB^{Man}$-C9A-His_6 in *E. coli* JM109 synthetisiert werden konnte. Wurde nun $EIIB^{Man}$-C9A statt $EIIB^{Man}$ verwendet, zeigte sich keine Verschlechterung der DNA-Bindungsaktivität von ManR-wt mehr (Abbildung 3–18B). Der negative Regulationseffekt von EII^{Man} auf ManR konnte damit durch Mutation des C9-Rests aufgehoben werden.

3.4 Entwicklung eines selbstinduzierenden Expressionssystems für die Hochzelldichtefermentation

Die Verwendung des Mannose Expressionssystems mit *B. subtilis* 3NA pMW168.1 erforderte in Hochzelldichtefermentationen die Verwendung einer sehr hohen Induktormenge, um konstant hohe Expressionsraten zu erhalten (Wenzel, 2009). Der Induktor D-Mannose gehört mit einem aktuellen Marktwert von ca. 1 € pro Gramm zwar nicht zu den teuersten Induktoren, die benötigte Menge von ca. 50 g bzw. 150 g für Fed-Batch-Fermentationen im 3 l- bzw. 8 l-Maßstab ist jedoch ökonomisch gesehen viel zu hoch (Wenzel, 2009). Anhand der charakteristischen Eigenschaften des EII^{Man} negativen Stamms *B. subtilis* TQ356 (*spo0A3 ΔmanP::ermC*) und der regulatorischen Erkenntnisse über ManR wurde in diesem Teil der Arbeit ein neuartiges, selbst-induzierendes Expressionssystem für die Hochzelldichtefermentation entwickelt. Des Weiteren wurden alternative Vektorsysteme konstruiert und getestet.

3.4.1 Die Deletion von *manA* führt zu einer Wachstumsinhibierung

Die naheliegenste Vorgehensweise, um den Induktorverbrauch zu verringern, führt i. d. R. über die Verhinderung des Induktorabbaus. Alternativ bedient man sich künstlicher Induktoren, die zwar induzierend wirken, aber nicht abgebaut werden können (z.B. IPTG). Die Mannose-6-phosphat-Isomerase katalysiert den ersten Schritt im Abbau von Mannose. Deren Inaktivierung durch Deletion von *manA* führte zwar in Schüttelkolbenexperimenten zu einem geringeren Induktorverbrauch, allerdings auch zu einer Wachstumshemmung nach Zugabe von Mannose (Wenzel, 2009). Die Zellen zeigten mit einer stark veränderten Morphologie (kugelkettige Zellform) einen hohen osmotischen Stress an, der auf eine intrazelluläre Akkumulation von Mannose-6-phosphat zurückzuführen sein könnte. Durch Mutation des ATG-Start-Codons von *manA* zu GTG bzw. TTG sollte die Umsetzungsrate reduziert werden. Eine Normalisierung der Morphologie konnte damit allerdings nicht erreicht werden (Wenzel, 2009). Dennoch wurde *B. subtilis* TQ281 (*spo0A3 ΔmanA::ermC*) pMW168.1 in Hochzelldichtefermentationen eingesetzt. Dabei zeigten sich allerdings keine signifikanten Vorteile gegenüber dem Wildtypstamm 3NA (Wenzel *et al.*, 2011).

Trotz Vorgabe der spezifischen Wachstumsrate auf μ_{set} = 0,1 h^{-1} in der Zufütterungsphase mit exponentieller Zulaufrate, wurde unter ebenfalls exponentieller Zufütterung von Mannose eine um etwa 10% niedrigere spezifische Wachstumsrate von μ_{ist} = 0,09 h^{-1} beobachtet. Nach 7 h Induktion in der Zufütterungsphase wurde eine Glucose-Akkumulation festgestellt. Interessanterweise war die Wachstumshemmung im Vergleich zu den Schüttelkolbenexperimenten in LB-Medium nicht so stark ausgeprägt. Auch zeigten die Zellen bei Wachstum im Bioreaktor keine auffälligen morphologischen Veränderungen.

3.4.2 Entwicklung einer Induktionsstrategie mit *B. subtilis* TQ356

Die Deletion von *manP* in *B. subtilis* TQ356 führt zu einer konstitutiven Expression sowohl bei P_{manR} als auch P_{manP}, die einer Katabolitrepression durch Glucose unterliegt (Sun und Altenbuchner, 2010). Die Erkenntnisse über die Regulation lassen vermuten, dass die PRD2 von ManR durch HPr-His-15~P phosphoryliert wird, wenn keine Glucose vorhanden ist. ManR würde damit in eine aktive Konformation versetzt werden, da in dieser Mutante keine Phosphorylierung seiner $EIIB^{Bgl}$- und $EIIA^{Fru}$-Domänen durch EII^{Man} stattfinden kann. Ist Glucose verfügbar, erfolgt eine Katabolitrepression: Sowohl durch Dephosphorylierung der ManR-PRD2 über HPr als auch über die Bindung des CcpA-HPr-Ser-46~P Komplexes an die *cre*-Sequenz in der P_{manR}-Region wird die Expression ausgehend von P_{manR} und P_{manP} verhindert.

Nach diesem Regulationsmodell kann man die Eigenschaften von *B. subtilis* TQ356 in einer Fed-Batch-Fermentation nutzen, um Proteine in der Zufütterungsphase bei konstant niedriger Wachstumsrate ohne Zugabe eines Induktors zu produzieren (Abbildung 3–19): In der Batch-Phase erfolgt durch die hohe Glucose-Konzentration im Medium und die damit verbundene Katabolitrepression keine Expression. Der Übergang in die Zufütterungsphase wird von einer Glucose-Limitation begleitet. In der Zufütterungsphase wird die zugefütterte Glucose sofort durch die Zellen aufgenommen und verstoffwechselt, sodass die Glucose-Konzentration im Reaktor annähernd gleich null bleibt. Die Induktion der Expression sollte somit mit dem Übergang in die Zufütterungsphase einsetzen und bis zum Ende der Fermentation anhalten.

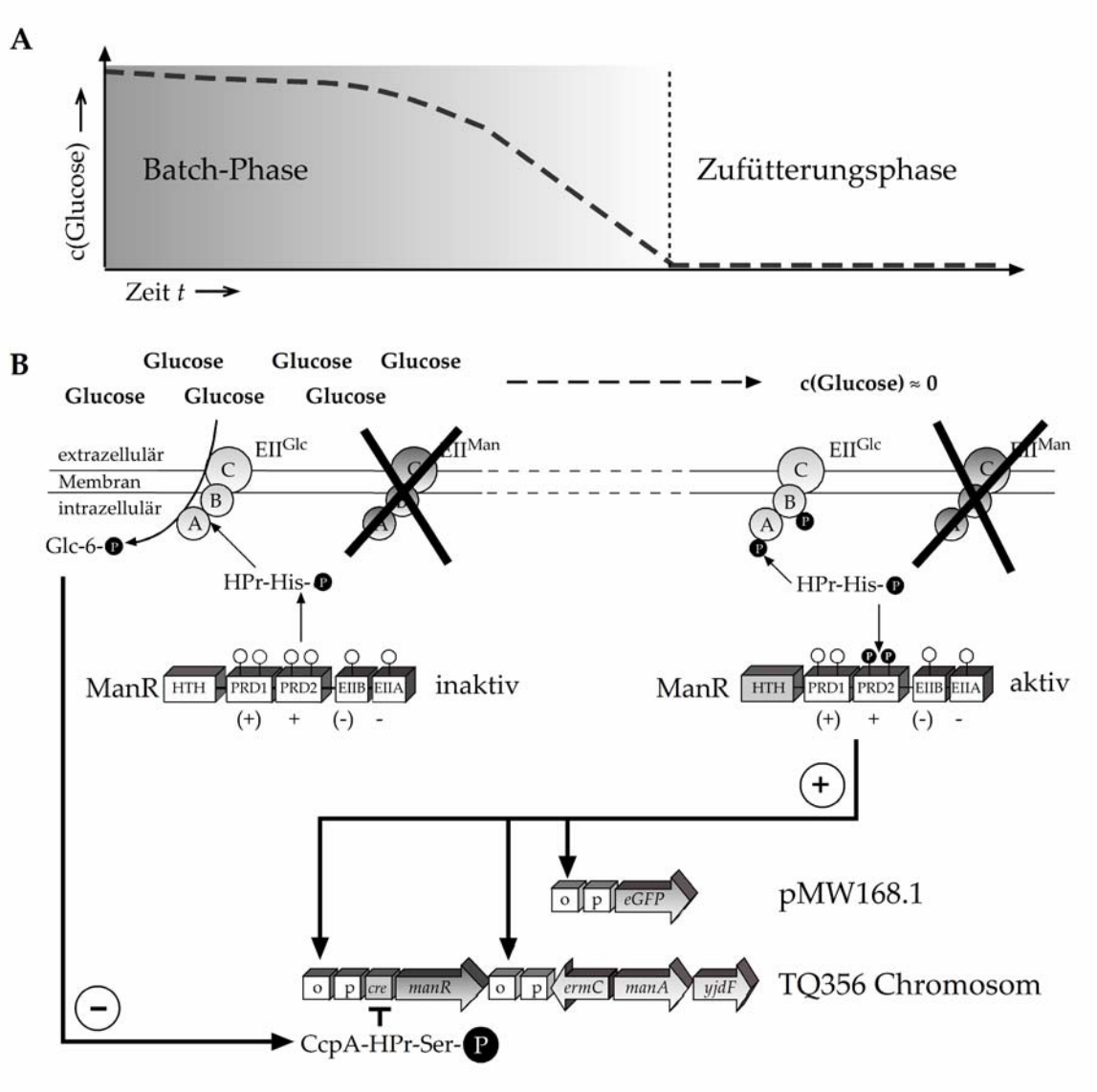


Abbildung 3-19: Fed-Batch-Strategie für das selbstinduzierende System mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1. (**A**) Zeitlicher Verlauf der Glucose-Konzentration im Bioreaktor während der Batch- und Zufütterungsphase. (**B**) Regulationsmodell: In der Batch-Phase (links) ist genügend Glucose vorhanden, um die Expression der Operongene und *eGFP* auf pMW168.1 über Katabolitrepression zu unterdrücken. Durch die Bildung des globalen Regulatorkomplexes CcpA-HPr-Ser~P kann dieser an die *cre*-Sequenz in der P_{manR}-Promotorregion binden. ManR wird nicht mehr gebildet. Die noch vorhandenen ManR-Moleküle sind in einem komplett unphosporylierten Zustand. In der Zufütterungsphase (rechts) wachsen die Zellen unter Glucose-Limitation, d.h. die Glucose-Konzentration im Bioreaktor ist ungefähr gleich null, da die zugefütterte Glucose sofort von den Zellen aufgenommen und verstoffwechselt wird. Eine Katabolitrepression findet jedoch nicht mehr statt und ManR kann gebildet werden. Aufgrund des Ausbleibens der negativen Regulation durch den Transporter EII^{Man}, befinden sich die vorhandenen ManR-Moleküle in einem aktiven Zustand und können so an die Operatorsequenzen binden und die Expression der chromosomalen Operongene und *eGFP* auf pMW168.1 initiieren.

3.4.3 Fed-Batch-Fermentation mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1

Durch Transformation von *B. subtilis* TQ356 mit dem Expressionsvektor pMW168.1 (P_{manP}-*eGFP;* pUB110-Derivat mit hoher Kopienzahl) und Verwendung dieses Stamms in Fed-Batch-Fermentationen wurde die entwickelte Strategie für das selbstinduzierende Expressionssystem überprüft. Durch den Einsatz einer Fluoreszenzsonde im Reaktor konnte die Bildung von eGFP während der gesamten Fermentation in Echtzeit verfolgt und aufgezeichnet werden (Abbildung 3–20).

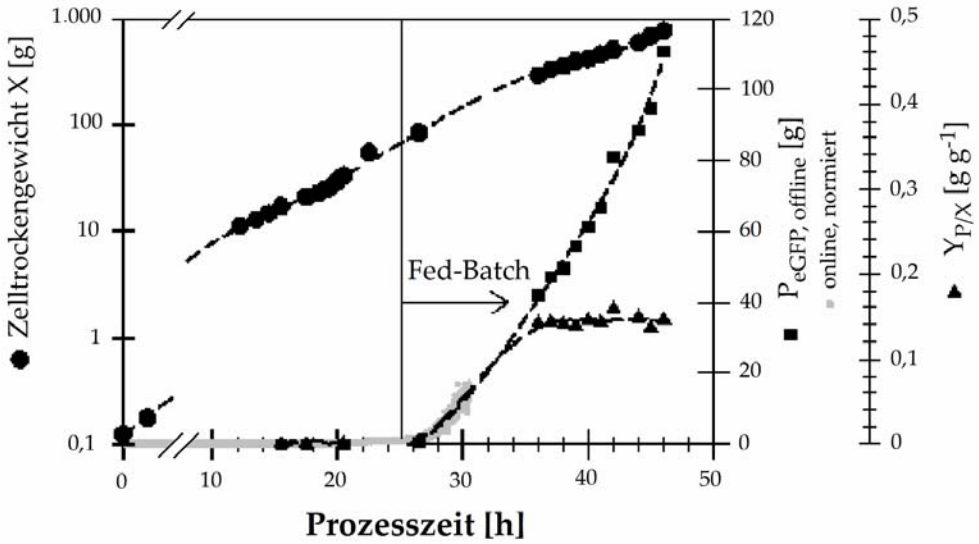


Abbildung 3-20: Fed-Batch-Fermentation mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 (verändert nach Wenzel *et al.*, 2011). Das Zelltrockengewicht (**X**, ●), das produzierte eGFP (**P_{eGFP}** offline & online, ■ bzw. ■) sowie die Produktausbeute (**$Y_{P/X}$**, ▲) wurden gegen die Prozesszeit aufgetragen. Der Beginn der Zufütterungsphase ist gekennzeichnet.

B. subtilis TQ356 pMW168.1 zeigte in der Batch-Phase keine signifikante Fluoreszenz. Mit Beginn der Übergangs- in die Zufütterungsphase stieg das Fluoreszenzsignal kontinuierlich an. Nach ca. 14 h in der Zufütterungsphase erreichte das Expressionsniveau ein Maximum, das durch ein konstantes Verhältnis ($Y_{P/X}$) von Produkt (P) zu Biomasse (X) von 14,6 % bis zum Ende der Fermentation gekennzeichnet war. Diese konstant hohe, spezifische Produktivität konnte mit den Standardsystemen *B. subtilis* 3NA pMW168.1 (*spo0A3*) bzw. *B. subtilis* TQ281 pMW168.1 (*spo0A3* Δ*manA::ermC*) nicht erzielt werden (Wenzel *et al.*, 2011). Ohne Zusatz eines Induktors konnten mit

dem neuen System insgesamt 9,8 g eGFP pro Liter produziert werden, entsprechend einer Produktausbeute von 14,6 g eGFP pro 100 g Zelltrockengewicht. Bei einer SDS-PAGE Analyse wurde der Anteil des produzierten eGFPs (ca. 29 kDa) auf ungefähr 20 % des Gesamtproteingehalts geschätzt (Abbildung 3–21). Auch in der unlöslichen Proteinfraktion sowie im Kulturüberstand wurden eGFP-Moleküle nachgewiesen. Da eGFP jedoch intrazellulär produziert wurde, ist letzteres vermutlich auf eine Zelllyse aufgrund der hohen Scherkräfte im Reaktor zurückzuführen.

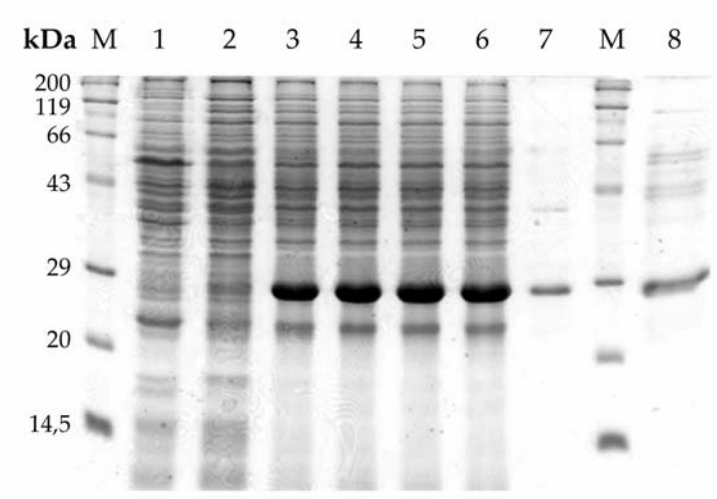


Abbildung 3-21: SDS-PAGE - Fed-Batch-Fermentation mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 (verändert nach Wenzel *et al.*, 2011). Spurbelegung: **M**, Roti-Mark Standard Proteinmarker; Spur **1**, lösliche Fraktion nach 12,5 h (BP); Spur **2**, lösliche Fraktion nach 20,5 h (BP); Spur **3**, lösliche Fraktion nach 36 h (13,5 h ZP); Spur **4**, lösliche Fraktion nach 41 h (18,5 h ZP); Spur **5**, lösliche Fraktion nach 44 h (21,5 h ZP); Spur **6**, lösliche Fraktion nach 46 h (23,5 h ZP, Prozessende); Spur **7**, unlösliche Fraktion nach 46 h; Spur **8**, Kulturüberstand nach 46 h. Abk.: BP = Batch-Phase, ZP = Zufütterungsphase.

Während der Fermentation wurde auch die Stabilität von pMW168.1 in *B. subtilis* TQ356 untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit Beginn der Zufütterungsphase auch die Anzahl an plasmidtragenden Zellen stetig abnahm. Zum Ende der Fermentation trugen nur noch knapp ein Drittel der Zellen den Vektor. Nichtsdestotrotz ging dieser Plasmidverlust nicht mit einem Ausbeuteverlust einher, da die Produktivität bis zum Ende der Fermentation auf einem konstant hohen Niveau blieb.

3.5 Alternative Vektorsysteme

Hinsichtlich der bekannten Instabilitäten von pUB110-Derivaten mit Fremd-DNA (Bron *et al.*, 1988), wurden in diesem Teil der Arbeit alternative Vektorsysteme bzw. Faktoren zur Stabilitätserhöhung erforscht. Zunächst wurde das selbstinduzierende System basierend auf dem sehr stabilen, nach dem Theta-Mechanismus replizierenden Vektor pBS72 aus *B. subtilis* (Titok *et al.*, 2003) angepasst. Da dieser Vektor eine 10-fach geringere Kopienzahl wie ein pUB110-Derivat aufweist, wurde dieses System außerdem so modifiziert, dass mit der Induktion der Expression auch die Plasmidkopienzahl des pBS72-Derivats erhöht werden konnte. Des Weiteren wurde der Einsatz des Alanin-Racemase Gens *alrA* aus *B. subtilis* als metabolischer Marker und Alternative zur Antibiotikaresistenz getestet.

3.5.1 Das pBS72-Replicon als Stabilitätsfaktor

Vektoren, die nach dem Theta-Mechanismus replizieren weisen meist eine niedrige Kopienzahl, dafür aber eine hohe Stabilität auf. Dazu gehört z.B. das aus Bodenproben isolierte Plasmid pBS72 aus *B. subtilis*, das eine Kopienzahl von ca. 5-6 pro Chromosom sowie eine hohe segregative und strukturelle Stabilität in *B. subtilis* 3NA aufweist (Titok *et al.*, 2003; Wenzel, 2009). Aus diesem Grund wurde das pUB110-Replicon im *eGFP*-Expressionsvektor pMW168.1 gegen das pBS72-Replicon ausgetauscht und damit die Plasmidkopienzahl von ca. 50 auf 5 Kopien pro Zelle reduziert (Abbildung 3-22A). Dieser neue Vektor, pMW483.1, sowie pMW168.1 wurden zum Vergleich jeweils in *B. subtilis* TQ356 gebracht und einem Stabilitätstest in LB-Medium bei 37 °C unterzogen (Abbildung 3–22B). Im Vergleich zu pMW168.1, der nach 25 Generationen zu über 80% und nach 50 Generationen zu 100% verloren ging, zeigte pMW483.1 eine deutlich höhere segregative Stabilität. Nach 100 Generationen trugen noch ca. 60% der Zellen den Vektor, die wiederum alle eine fluoreszierende Aktivität aufwiesen. Beide Vektoren waren in *B. subtilis* TQ356 strukturell stabil und alle Zellen, die einen Vektor trugen, fluoreszierten.

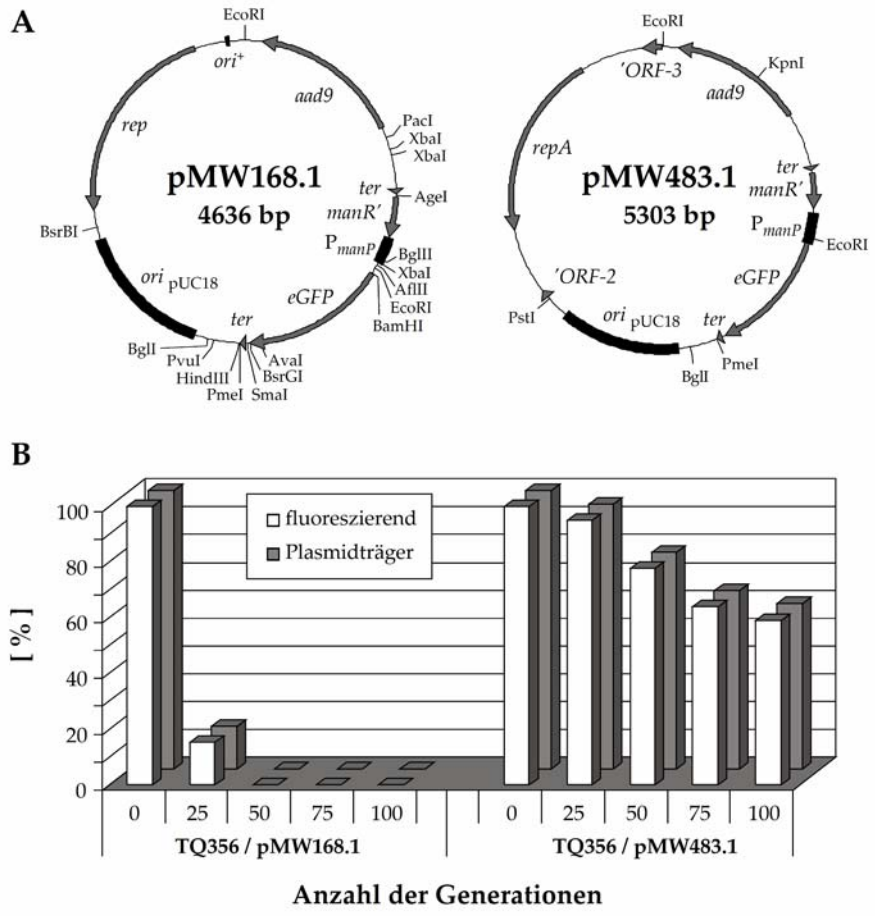


Abbildung 3-22: Einfluss des Replicons auf die Plasmidstabilität. (**A**) Plasmidkarten der *eGFP*-Expressionsvektoren pMW168.1 (pUB110-Derivat) und pMW483.1 (pBS72-Derivat). Eingezeichnet sind die jeweils verwendeten Restriktionsschnittstellen zur Konstruktion. (**B**) Plasmidstabilitätstest von *B. subtilis* TQ356 (*spo0A3* Δ*manP*::*ermC*) mit pMW168.1 bzw. pMW483.1. Aufgetragen sind die Prozentzahlen der plasmidtragenden bzw. fluoreszierenden Zellen nach der angegebenen Anzahl der Generationen (unter nicht-selektiven Bedingungen). Die Standardabweichung betrug unter 10%.

Mit *B. subtilis* TQ356 pMW483.1 wurden ebenfalls Fed-Batch-Fermentationen durchgeführt. Im Vergleich zu *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 zeigte das neue System allerdings trotz einer sehr hohen Plasmidstabilität von 92% zum Ende der Fermentation wesentlich geringere Ausbeuten und Produktivitäten (s. Kapitel 3.5.3, Tabelle 3–9).

3.5.2 Chromosomale Integration von *repA* ermöglicht Kopienzahlerhöhung pBS72-basierten Vektoren

Wie gezeigt werden konnte, ist die Replikation der pBS72-Derivate vom Initiatorprotein RepA und den Iterons in der Region des Replikationsstarts abhängig (Wenzel, 2009): Werden alle Iterons durch RepA gebunden, wird die Replikation initiiert. Der Anstieg der Plasmidkopienzahl ist mit einem Anstieg der RepA-Konzentration verbunden. Allerdings reicht die Anzahl der RepA-Moleküle irgendwann nicht mehr aus, um alle Iterons zu besetzen, und es kommt zu einer Wechselwirkung der RepA-Moleküle *in trans*, wodurch die Replikation verhindert wird [*Handcuffing*-Mechanismus; (Chattoraj, 2000)]. Die Plasmidkopienzahl wird somit durch die Anzahl der RepA-Moleküle reguliert. Eine höhere Konzentration von RepA müsste demnach auch zu einer höheren Kopienzahl führen, da das *Handcuffing* erst später einsetzen würde. Aus diesem Grund sollte das *B. subtilis* TQ356 pMW483.1 System so modifiziert werden, dass nicht nur *eGFP* sondern auch *repA* induziert wird, um so die Kopienzahl von pMW483.1 zu steigern.

Hierfür wurde *repA* über PCR amplifiziert (s6780/s6781) und unter die Kontrolle von P_{manP} gebracht (pMW589.1). Die so konstruierte P_{manP}-*repA* Kassette wurde in den Integrationsvektor pMW523.1 kloniert (pMW601.6; s. Abbildung 3–23A) und über das pHM30/pHM31-System (Motejadded und Altenbuchner, 2007) unmittelbar stromabwärts des Gens *hisI* ins Genom von *B. subtilis* TQ356 integriert. Dadurch wurde der Stamm *B. subtilis* MWZ 9 (*spo0A3 hisI-*P_{manP}*-repA* Δ*manP::ermC*) erhalten, der wiederum mit pMW483.1 transformiert wurde. Zum Vergleich wurden ÜK von *B. subtilis* TQ356 pMW483.1 und *B. subtilis* MWZ 9 pMW483.1 in LB-Medium unter voll induzierenden Bedingungen hergestellt, wobei die Expression von *eGFP* und *repA* selbstinduziert wurde. Aus jeweils 10 OD_{600} Zellen wurden die Plasmide isoliert und einer Agarosegelelektrophorese unterzogen (Abbildung 3–23B). Dabei zeigte sich bei *B. subtilis* MWZ 9 wiederholt eine pMW483.1-Bande mit signifikant höherer Intensität als bei *B. subtilis* TQ356. Dies ist vermutlich auf eine höhere Kopienzahl in *B. subtilis* MWZ 9 zurückzuführen.

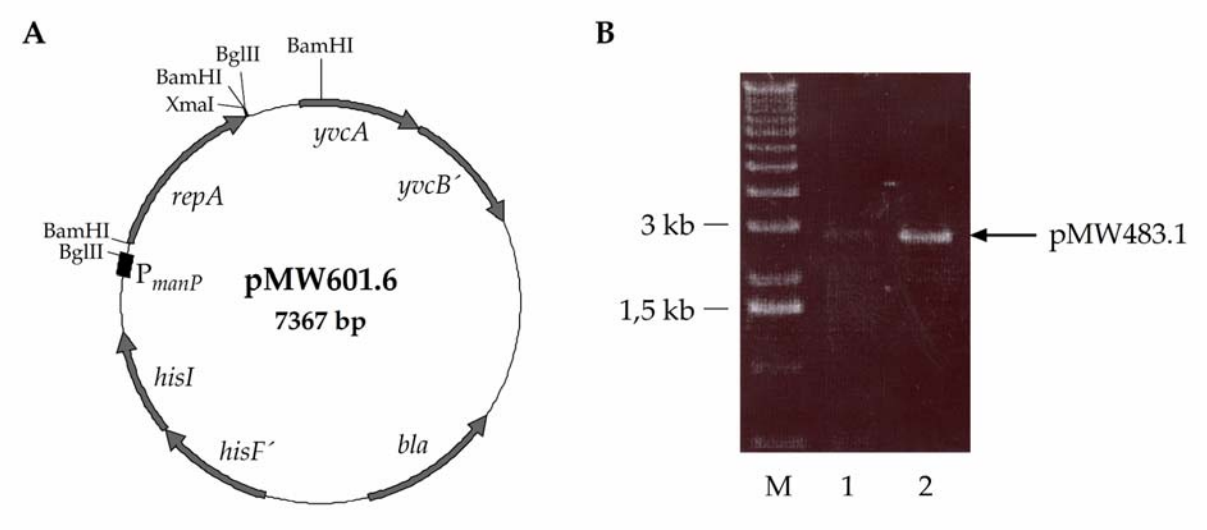


Abbildung 3-23: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der pMW483.1-Kopienzahlerhöhung durch chromosomale Integration einer P_{manP}-*repA*-Expressionskassette. Aus jeweils 10 OD_{600} von *B. subtilis* TQ356 pMW483.1 (Spur **1**) bzw. *B. subtilis* MWZ 9 pMW483.1 (Spur **2**) wurden die Plasmide isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit), in jeweils 50 µl eluiert und davon 5 µl aufgetragen. Der Versuch wurde 3× wiederholt. **M,** GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Mit *B. subtilis* MWZ 9 pMW483.1 wurden Fed-Batch-Fermentationen durchgeführt. In der Tat führte die chromosomale Integration der P_{manP}-*repA* Kassette zu mehr als doppelt so hohen Ausbeuten und Produktivitäten wie ohne die Integration (s. Kapitel 3.5.3, Tabelle 3–9). Dafür nahm jedoch die Plasmidstabilität in diesem System von 92 auf 67% wieder deutlich ab. Im Gegensatz zum pUB110-basierten System mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 waren die Ausbeuten und Produktivitäten aber immer noch um etwa die Hälfte geringer.

3.5.3 Alanin-Racemase Gen *alrA* als Selektionsmarker

Die Alanin-Racemase (EC 5.1.1.1) wird benötigt, um aus L-Alanin die in der Zellwand benötigte Aminosäure D-Alanin herzustellen (Abbildung 3–24). Als Cofaktor benötigt dieses Enzym Pyridoxal-5′-phosphat (PLP) (Walsh, 1989). Eine Inaktivierung dieser Enzymfunktion ist für die Zelle tödlich, da keine Zellwand mehr synthetisiert werden kann. Das Gen für die Alanin-Racemase stellt demnach einen starken, metabolischen Marker für die Selektion von Plasmiden dar.

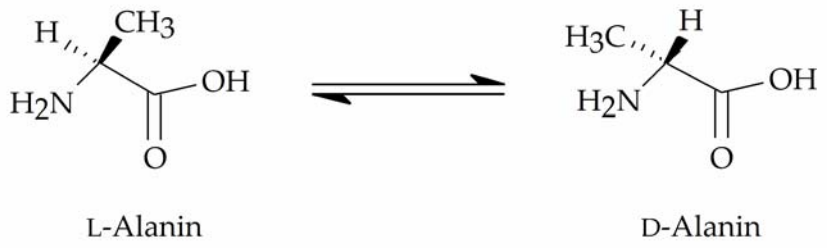


Abbildung 3-24: Katalysierte Reaktion der PLP-abhängigen Alanin-Racemase (EC 5.1.1.1).

In *B. subtilis* 168 existieren laut Eintrag in der GenoList Datenbank[9] zwei Gene, *alrA* (BSU04640) und *alrB* (BSU17640), die für eine Alanin-Racemase codieren. Allerdings wurde nur *alrA* als essentielles Gen für *B. subtilis* nachgewiesen [(Kobayashi *et al.*, 2003); BSORF Datenbank[10]]. Daher wurde nur *alrA* im Genom von *B. subtilis* MWZ 9 (*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*repA* Δ*manP*::*ermC*) bzw. TQ356 (*spo0A3* Δ*manP*::*ermC*) mithilfe des temperatursensitiven Vektors pMW521.1, der auf dem pE194^{ts}-Replicon basiert, markerfrei deletiert. Dafür wurden zunächst ca. 1kb der stromauf- und stromabwärts liegenden Regionen von *alrA* über PCR amplifiziert (s7289/s7290 bzw. s7291/ s7292) und über eine 3-Fragment-Ligation in pMW521.1 gebracht, sodass der Integrationsvektor pMW748.1 entstand. *B. subtilis* MWZ 9 und TQ356 wurden daraufhin mit pMW748.1 transformiert und *alrA* durch homologe Rekombination in diesen Stämmen markerlos deletiert. Dadurch wurden die Stämme MWZ 14 (*spo0A3 hisI*-

[9] http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList

[10] http://bacillus.genome.ad.jp/

P_{manP}-*repA* Δ*manP*::*ermC* Δ*alrA*) bzw. MWZ 15 (*spo0A3* Δ*manP*::*ermC* Δ*alrA*) erhalten, die nicht mehr auf LB-Medium ohne die Zugabe von D-Alanin wachsen können.

Durch diese D-Alanin-Auxotrophie kann nun *alrA* auf einem Expressionsvektor als metabolischer Selektionsmarker verwendet werden, wie es bereits u.a. für *B. subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* und einige Milchsäurebakterien gezeigt werden konnte (Bron *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 1985; Tauch *et al.*, 2002). Dafür sollte *alrA* zunächst mit seinem eigenen Promotor über PCR amplifiziert (s7366/s7434) und in pMW483.1 gebracht werden. Während die Klonierung in *E. coli* JM109 mehrfach scheiterte, konnte der Expressionsvektor pMW791.1 (Plasmidkarte s. Abbildung 3–25A) jedoch in *B. subtilis* MWZ 14 durch Selektion auf LB-Medium (→ D-Alanin-Prototrophie) direkt kloniert werden. Die Transformation von *E. coli* JM109 mit pMW791.1 führte zu winzigen Kolonien.

Die konstitutive Expression von *alrA* aus *B. subtilis* scheint bei *E. coli* offensichtlich zu einer Wachstumsinhibierung zu führen. Um die Expression von *alrA* zu reduzieren, wurde die -35 Region des *alrA* Promotors von 5′-TAGACA-3′ zu 5′-TTTACA-3′ geändert, um die Bindung der RNA-Polymerase und damit die Transkriptionsrate zu verschlechtern. Dieser Vektor (pMW887.1) ließ sich jedoch wieder nur in *B. subtilis* MWZ 14 konstruieren und führte in *E. coli* JM109 ebenfalls zu winzigen Kolonien.

Da die Vektoren auf einem pUC18-Replicon basieren, sind die Kopienzahl und damit auch die Gendosis von *alrA* sehr hoch. Um dies zu reduzieren, wurde die pUC18-Replikationsregion des Vektors pMW483.1 gegen diejenige des Vektors pACYC184 mit niedriger Kopienzahl (Rose, 1988; Sambrook *et al.*, 1989) ausgetauscht (pMW965.3). Die Klonierung von *alrA* war jedoch wieder nur in *B. subtilis* MWZ 14 erfolgreich (pMW967.1). Dieser Vektor führte in *E. coli* JM109 hauptsächlich zu winzigen, aber auch einigen normal gewachsenen Kolonien.

Als weitere Möglichkeit, die Transkriptionsrate von *alrA* zu reduzieren, wurde der vermutlich schwach konstitutive Promotor des Gens *aad9*, welches für eine Spectinomycin-Adenyltransferase codiert (Le Blanc *et al.*, 1991) und auf den verwendeten Expressionsvektoren vorhanden ist, in Betracht gezogen. Über eine *Overlap Extension*-PCR (s7963/s7964-s7965/s7966) wurde *alrA* inkl. seiner Shine-

Dalgarno-Sequenz (Ribosomenbindestelle) unmittelbar stromabwärts von *aad9* in die Vektoren pMW168.1 bzw. pMW483.1 eingefügt. Die resultierenden Vektoren pMW972.2 bzw. pMW977.1 (Abbildung 3–25A) wurden zwar direkt in *B. subtilis* MWZ 14 konstruiert, führten in *E. coli* JM109 jedoch zu einem normalen Kolonienwachstum.

Die *B. subtilis* Stämme MWZ 14 und MWZ 15 wurden daraufhin mit den Vektoren pMW791.1, pMW972.2 bzw. pMW977.1 transformiert und anschließend einem Stabilitätstest in LB-Medium bei 37°C unterzogen (Abbildung 3–25B+C). Dabei wurden auch die fluoreszierenden Eigenschaften der entstandenen Kolonien getestet. Es zeigte sich, dass die Vektoren in beiden Stämmen über 100 Generationen zu 100% an die Tochterzellen weitergegeben wurden. Jedoch entstanden mit pMW972.2 (pUB110-Derivat) Kolonien, die nicht mehr fluoreszierten. Auffällig war hierbei der unterschiedlich hohe prozentuale Anteil an fluoreszierenden Zellen in den getesteten Stämmen. Während nach 75 Generationen in beiden Fällen noch ca. 65% der Zellen fluoreszierten, waren es nach 100 Generationen bei *B. subtilis* MWZ 14 nur noch 25% und bei *B. subtilis* MWZ 15 immer noch ca. 65%. Die Plasmide wurden aus einigen der nicht-fluoreszierenden Klone isoliert und per Restriktionsanalyse überprüft. Es zeigte sich, dass einige der nicht-fluoreszierenden Klone Plasmide trugen, die in Form von Deletionen strukturell verändert waren (nicht gezeigt).

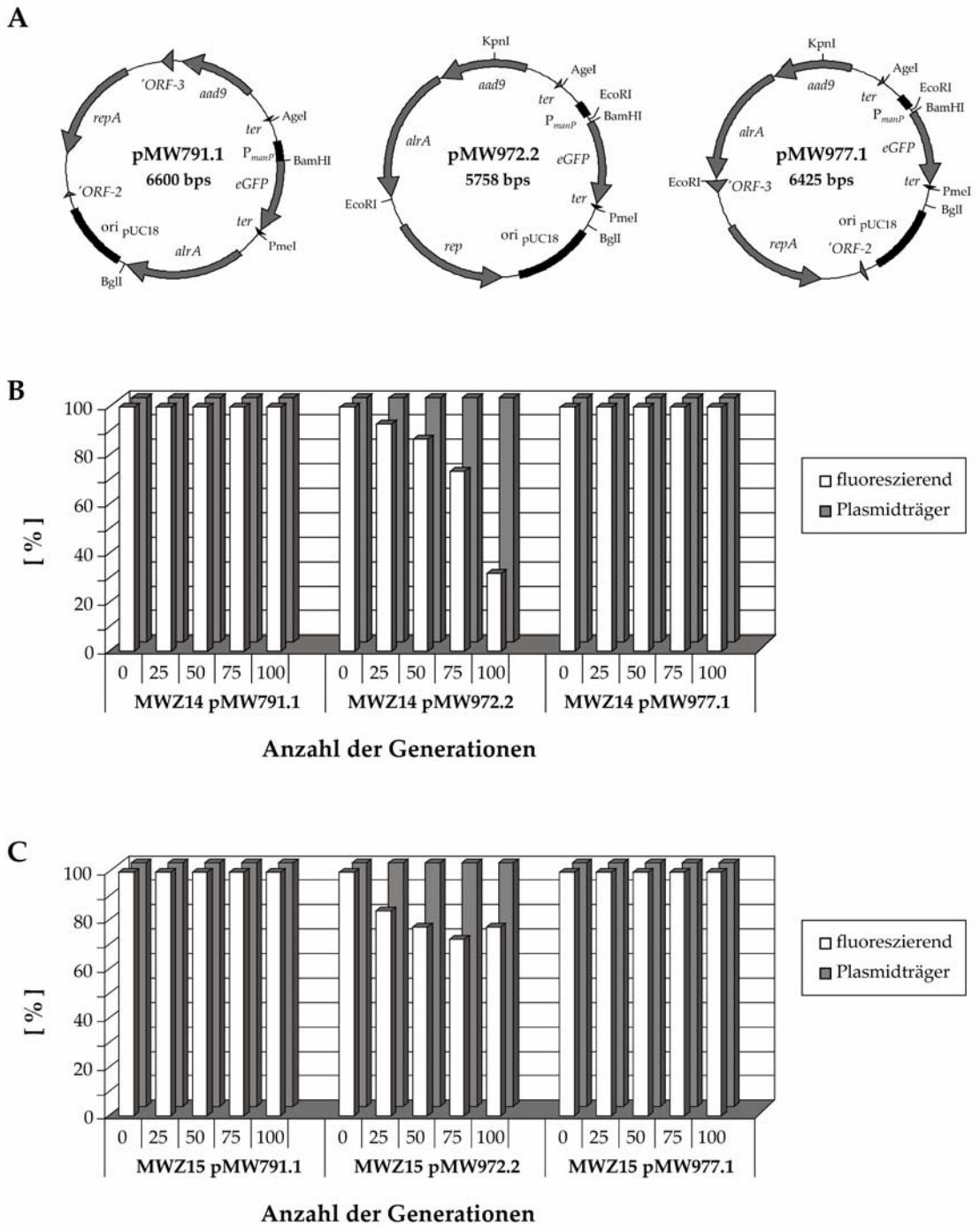


Abbildung 3-25: Plasmidstabilitätstests mit *B. subtilis* MWZ 14 und MWZ 15. (**A**) Physikalische Karten der *eGFP*-Expressionsvektoren pMW791.1 (pBS72-Derivat mit P_{alrA}-*alrA*), pMW972.2 (pUB110-Derivat mit P_{aad9}-*aad9-alrA*) und pMW977.1 (pBS72-Derivat mit P_{aad9}-*aad9-alrA*). Plasmidstabilitätstest von (**B**) *B. subtilis* MWZ 14 (*spo0A3 hisI*-P_{manP}-*repA* Δ*manP*::*ermC* Δ*alrA*) und (**C**) MWZ 15 (*spo0A3* Δ*manP*::*ermC* Δ*alrA*) mit pMW791.1, pMW972.2 bzw. pMW977.1. Aufgetragen sind die Prozentzahlen der plasmidtragenden bzw. fluoreszierenden Zellen nach der angegebenen Anzahl der Generationen (unter nicht-selektiven Bedingungen; LB-Medium, 37 °C). Die Standardabweichung betrug unter 10 %.

Da pMW972.2 in *B. subtilis* MWZ 15 jedoch eine weit bessere Stabilität aufwies als pMW168.1 in *B. subtilis* TQ356, wurde mit *B. subtilis* MWZ 15 pMW972.2 ebenfalls eine Fed-Batch-Fermentation durchgeführt. Erstaunlicherweise zeigte der Vektor eine sehr hohe segregative Instabilität mit ca. 65% Verlust am Ende der Fermentation. Bereits in der zweiten Vorkultur, die ohne Antibiotikum gefahren wurde, zeigten sich Zellen, die keinen Vektor mehr enthielten und ein stark vergrößertes Kolonienwachstum aufwiesen. Mit Beginn der Zufütterungsphase nahm die Prozentzahl der plasmidtragenden Zellen sehr rasch ab, sodass sowohl die Ausbeute als auch die Produktivitäten im Vergleich zu *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 um bis zu 95% geringer ausfielen (Tabelle 3–9).

Tabelle 3-9: Vergleich der verschiedenen Vektorsysteme mittels repräsentativen Ergebnissen aus 2 bis 3 durchgeführten Fed-Batch-Fermentationen. Die angegebenen Werte beziehen sich jeweils auf das Ende der jeweiligen Fermentation, d.h. nach durchschnittlich ca. 45 h Gesamtlaufzeit bzw. nach ca. 25 h in der Zufütterungsphase. Symbolik: c_{eGFP}^{final}: eGFP-Konzentration im Bioreaktor; $Y_{P/X}^{final}$: Produktausbeute in g eGFP pro 100 g Zelltrockengewicht (engl. *cell dry weight*, CDW); r_P: spezifische Produktivität; q_P: volumetrische Produktivität. Stabilität des Vektors in % plasmidtragende Zellen am Ende der Fed-Batch-Fermentation.

Verwendetes System	c_{eGFP}^{final} [g l^{-1}]	$Y_{P/X}^{final}$ [%]	r_P [g_{eGFP} g_{CDW}^{-1} h^{-1}]	q_P [g_{eGFP} l^{-1} h^{-1}]	Stabilität [%]
B. subtilis TQ356 pMW168.1	9,80	14,6	$6{,}23 \times 10^{-3}$	0,40	34
B. subtilis TQ356 pMW483.1	2,44	3,2	$1{,}19 \times 10^{-3}$	0,09	92
B. subtilis MWZ 9 pMW483.1	4,64	8,0	$3{,}20 \times 10^{-3}$	0,19	67
B. subtilis MWZ 15 pMW972.2	0,49	1,1	$0{,}51 \times 10^{-3}$	0,02	33

3.6 Der Casamino Acids Effekt

Bei der Vorkulturführung von *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 für die Fed-Batch-Fermentationen kamen zwei unterschiedliche Medien zum Einsatz: Als Vorkulturmedium 1 (VK1) wurde Spizizen's Minimalmedium (SMM) mit Casamino Acids (CA), und als Vorkulturmedium 2 (VK2) ein für die Hochzelldichtefermentation von *E. coli* entwickeltes Medium verwendet (Wilms *et al.*, 2001). Interessanterweise zeigten ÜK von *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 in diesen Medien bei ähnlich hohen optischen Dichten unterschiedliche fluoreszierende Aktivitäten. Während in VK1-Medium kaum eine Fluoreszenz beobachtet wurde, fluoreszierten die Zellen in VK2-Medium sehr stark. In diesem Teil der Arbeit wurde diesem Phänomen genauer nachgegangen.

3.6.1 Analyse der Medienzusammensetzung

Um die Ursache für dieses Verhalten zu finden, wurde zunächst die Zusammensetzung von VK1- und VK2-Medium verglichen (s. Kapitel 2.2.5, Tabelle 2–7 und 2–8). Bei den Nährsalzen zeigte sich v.a. bei der NH_4^+-Konzentration ein signifikanter Unterschied. Diese war in VK2 mit 21,7 mM fast 3-fach so hoch wie in VK1 mit nur 7,6 mM. Eine Angleichung der NH_4^+-Konzentration in VK1 führte allerdings nicht zu einer stärker fluoreszierenden ÜK. Auf der anderen Seite konnte ein Stickstoff-Mangel in VK1 durch Messung der NH_4^+-Konzentrationen in den ÜK ausgeschlossen werden.

Die markantesten Unterschiede der beiden Medien liegen jedoch zum einen an den Spurenelementen (SEL), die nur im VK2-Medium eingesetzt wurden, und zum anderen an den CA, die wiederum nur im VK1-Medium zum Einsatz kamen. Daher wurden beide Medien ohne SEL bzw. CA hergestellt und darin ÜK von *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 angezogen. Diese zeigten in beiden Fällen kaum Fluoreszenz (Abbildung 3–26A).

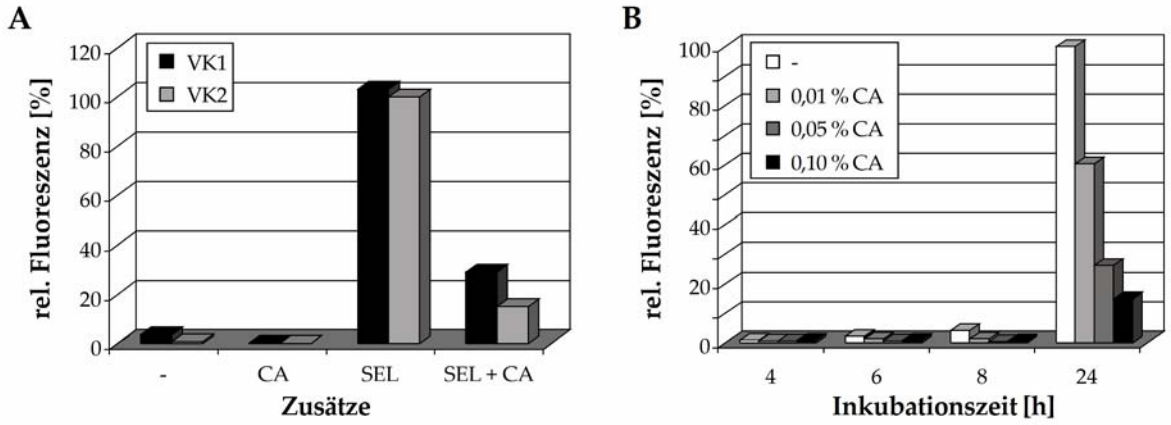


Abbildung 3-26: Einfluss der CA und SEL in VK1- und VK2-Medium. (**A**) Effekt der CA und SEL auf die Fluoreszenz in ÜK von *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 in VK1- und VK2-Medium. (**B**) Effekt von steigenden CA-Mengen nach 4, 6, 8 und 24 h Inkubation von *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 in VK2-Medium. Die spezifische Fluoreszenz (100 µl Kultur mit 0,3 OD_{600}) wurde in drei unabhängigen Experimenten gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Normierung der Werte orientiert sich am Mittelwert der Fluoreszenz nach 24 h in VK2-Medium (mit SEL, ohne CA). Die Standardabweichung betrug weniger als 15 %.

Erst die Zugabe von CA und SEL in beide Medien führte zu folgenden Effekten: Die SEL führten zu einer stärkeren Fluoreszenz, während CA diese wiederum senkte. Dies war besonders deutlich in Anwesenheit von SEL zu beobachten. Je mehr CA einer *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 Kultur z.B. in VK2 mit SEL zugegeben wurden, desto geringer war die beobachtete Fluoreszenz (Abbildung 3–26B).

3.6.2 Einfluss der Spurenelementlösung

Der Zusatz der SEL, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2–8 (Kapitel 2.2.5) gezeigt wird, führte bei beiden Medien zu einer deutlich höheren Fluoreszenz. Die SEL sollten ursprünglich ein schnelleres Wachstum von *E. coli* gewährleisten (Wilms *et al.*, 2001). Ein Wachstumsexperiment mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 in VK1 (mit CA) und VK2 (mit SEL) zeigte in den ersten 8 h Inkubation bei 37°C mit μ_{max} = 0,47 h^{-1} (VK1) bzw. μ_{max} = 0,5 h^{-1} (VK2) einen geringen Unterschied in der spezifischen Wachstumsrate (Abbildung 3–27A). Nach 24 h wurde in VK2 eine Abnahme der OD_{600} festgestellt, während die Zellen in VK1 eine höhere OD_{600} aufwiesen.

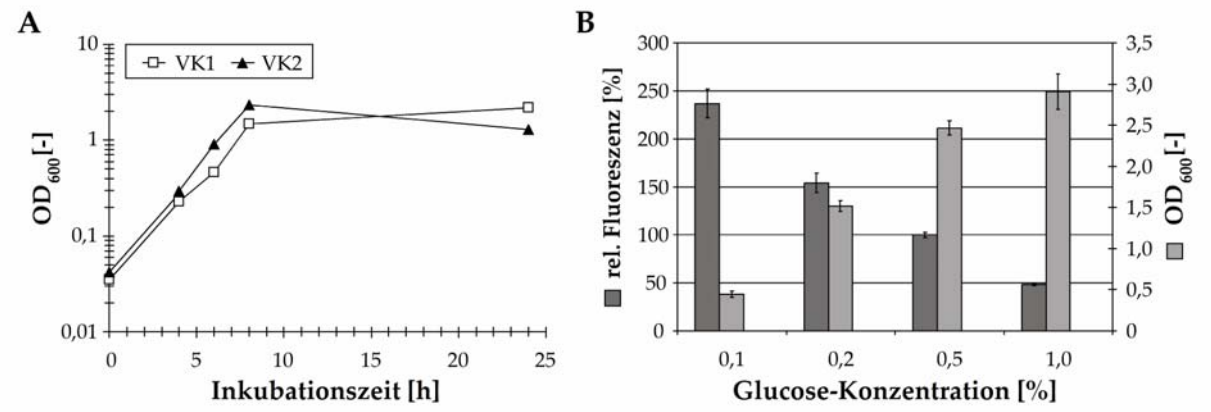


Abbildung 3-27: Einfluss der SEL auf das Zellwachstum und die *eGFP*-Expression. (**A**) Wachstumskinetik von *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 in VK1- bzw. VK2-Medium bei 37 °C. Aufge-tragen sind die Mittelwerte der OD_{600} aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung betrug< 10 %. (**B**) Effekt der Glucose-Konzentration in VK2-Medium mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1. Die spezifische Fluoreszenz (100 µl Kultur mit 0,3 OD_{600}) sowie die OD_{600} wurden in drei unabhängigen Experimenten nach jeweils 24 h gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Normierung der Werte orientiert sich am Mittelwert der Fluoreszenz nach 24 h in VK2-Medium mit 0,5 % (w/v) Glucose. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Eine Abnahme der OD_{600} über Nacht könnte bedeuten, dass die Zellen die Stationär- und Absterbephase früher erreicht hatten und damit länger in Glucose-Limitation waren. Dies würde wiederum zu einer längeren Produktionsphase für eGFP führen. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde VK2-Medium mit unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen hergestellt und mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 getestet (Abbildung 3–27B). Die Verdopplung der Glucose-Konzentration auf 1,0% (w/v) führte nach 24 h zu einer höheren Zelldichte und geringerer Fluoreszenz. Im entgegengesetzten Fall war die beobachtete Fluoreszenz höher, sobald weniger Glucose als 0,5% (w/v) eingesetzt wurde.

Um zu klären, ob dieser Effekt einzelnen Komponenten der SEL zugeschrieben werden kann, wurden zum einen nur die Einzelkomponenten in der Konzentration wie in den SEL eingesetzt (Abbildung 3–28A), und zum anderen jeweils eine der Komponenten weggelassen (Abbildung 3–28B).

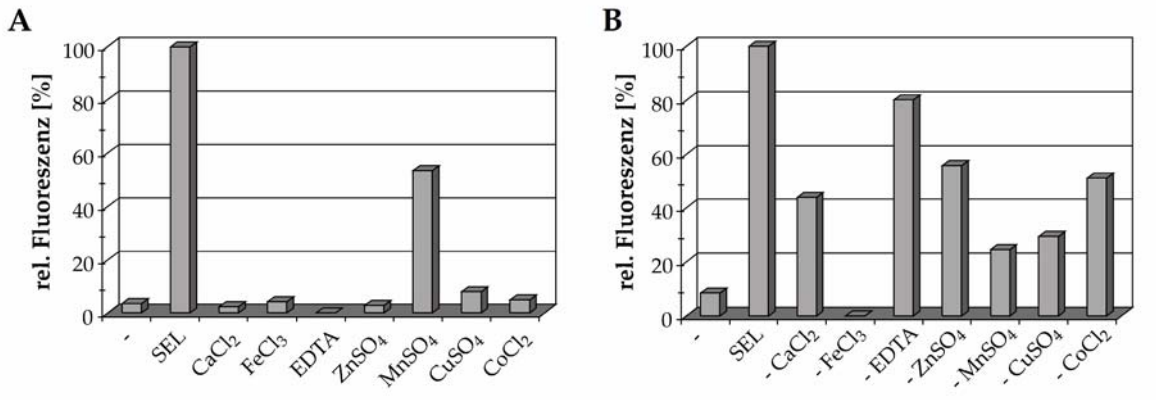


Abbildung 3-28: Einfluss der SEL-Komponenten. Gezeigt ist die relative Fluoreszenz von *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 ÜK in VK2-Medium ohne SEL (-), mit SEL sowie (**A**) den einzelnen Komponenten der SEL und (**B**) SEL abzüglich jeweils einer der Komponenten. Die spezifische Fluoreszenz (100 µl Kultur mit 0,3 OD_{600}) wurde in drei unabhängigen Experimenten nach jeweils 24 h gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Normierung der Werte orientiert sich am Mittelwert der Fluoreszenz nach 24 h in VK2-Medium mit SEL. Die Standardabweichung betrug weniger als 10 %.

Bei Zugabe der einzelnen Komponenten zeigten nur Mn^{2+}-Ionen einen positiven Effekt auf die Fluoreszenz mit knapp 54% des Niveaus mit SEL. Die Zugabe von EDTA führte zu einer Wachstumsinhibierung. Im umgekehrten Fall führte das Weglassen von Mn^{2+}- und Cu^{2+}-Ionen zur niedrigsten Fluoreszenz. Interessanterweise brachten SEL ohne $FeCl_3$ wachstumsgehemmte und nicht-fluoreszierende Zellen hervor. Eine Erklärung hierfür konnte jedoch nicht gefunden werden. Mn^{2+}-Ionen scheinen demnach den deutlichsten Effekt auf die Fluoreszenz auszuüben. Durch die Zugabe der 10-fachen Mn^{2+}-Konzentration konnte die Fluoreszenz auf ca. 80 % des Niveaus mit SEL weiter erhöht werden (nicht gezeigt).

3.6.3 Einfluss der Casamino Acids

Bei der Induktion von *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 wurde beobachtet, dass CA eine reprimierende Wirkung auf die Expression von *eGFP* zeigen. Der Zusatz von 0,02 % (w/v) CA führte sowohl in VK1 als auch VK2 zu einer Reduktion der Fluoreszenz um ca. 60 %. Dieser Repressionseffekt war unabhängig von der CA-Charge und auch davon, ob die CA Lösung autoklaviert oder schonend sterilfiltriert wurde (nicht gezeigt).

Anhand des Analysezertifikats der CA des Herstellers (s. Anhang, Tabelle 6–1) wurde eine synthetische Aminosäurelösung (AS-Mix) zusammengestellt, um zu testen, ob auch hiermit ein Repressionseffekt beobachtet werden kann. Dabei wurden die in den CA frei vorkommenden Aminosäuren in der gleichen Konzentration gemischt. Die in Form von Peptiden gebundenen Aminosäuren wurden dabei nicht berücksichtigt. Darüber hinaus wurden vitaminreduzierte CA (CAVF), sowie verschiedene Casein Hydrolysate getestet: *Casein Enzymatic Hydrolysate* (CEH), Trypton und Casitone (alle Becton Dickinson). Anhand der Ergebnisse (Abbildung 3–29) zeigte sich, dass nur die CA die Fluorezenz signifikant reduzierten.

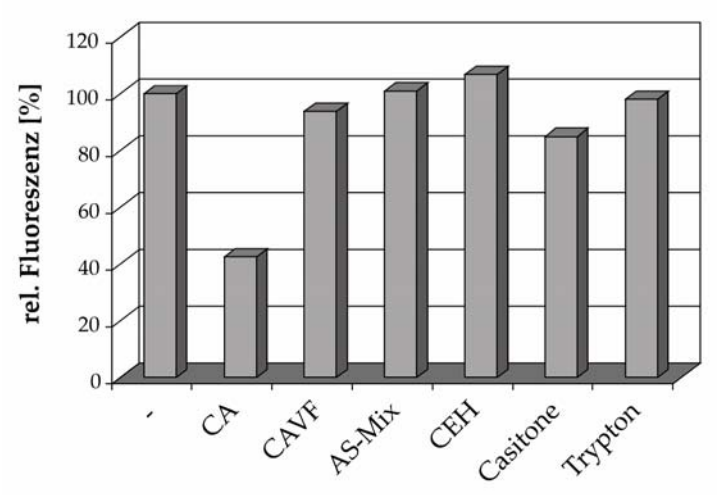


Abbildung 3-29: Einfluss von CA, vitaminfreien CA (CAVF), *Casein Enzymatic Hydrolysate* (CEH), einer synthetischen Aminosäuremischung (AS-Mix), Casitone und Trypton in VK2-Medium auf die Expression von *eGFP* in *B. subtilis* TQ356 pMW168.1. Die spezifische Fluoreszenz (100 µl Kultur mit 0,3 OD_{600}) wurde in drei unabhängigen Experimenten nach jeweils 24 h gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Normierung der Werte orientiert sich am Mittelwert der Fluoreszenz nach 24 h in VK2-Medium mit SEL [-]. Die Standardabweichung betrug weniger als 10 %.

Der analytische Vergleich von CA mit CEH, Casitone und Trypton (s. Anhang, Tabelle 6–1) zeigte, dass in den CA keine freien Kohlenhydrate vorkommen, die den Effekt durch eine Katabolitrepression erklären könnten. Dafür kommen in CA im Vergleich zu den anderen Casein-Hydrolysaten allerdings vermehrt Asche (u.a. Na_2CO_3, $NaHCO_3$), NaCl, freies Alanin, Glutamat und Prolin vor. Ein Einfluss der drei genannten Aminosäuren konnte durch den Einsatz des AS-Mix bereits

ausgeschlossen werden. Der Einfluss von NaCl und Asche (Na_2CO_3) wurde ebenfalls getestet, ein Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden. Der pH-Wert blieb bei diesen Versuchen konstant.

Überraschenderweise zeigten die vitaminreduzierten CAVF im Gegensatz zu CA keinen Effekt. Ob diese Vitaminreduktion den Effekt aufhebt bzw. ob umgekehrt eine Vitaminzugabe zu einer Wirkung wie mit CA führen könnte, sollte daher geklärt werden. Das Analysezertifikat des Herstellers gab Aufschluss, welche Vitamine in den CAVF reduziert wurden. Anhand dessen wurde nach einer Vitaminlösung mit diesen Vitaminen gesucht, und die „Kao & Michayluk Vitaminlösung (KMVL)“ gefunden. Um zunächst herauszufinden, wie viel KMVL ungefähr zugegeben werden muss, wurde dessen Zusammensetzung mit den für die CAVF angegebenen Grenzwerten verglichen (Tabelle 3–10).

Tabelle 3-10: Analyse der Vitaminzusammensetzung der Kao & Michayluk Vitaminlösung (KMVL) im Vergleich zu den Grenzwertangaben für die CAVF.

Komponente	**KMVL** 100x ng g^{-1}	**CAVF** max. ng g^{-1}
Biotin	10	0.36
Calciumpantothenat	1000	48
Folsäure	400	3.96
Nicotinamid	1000	204
Riboflavin	200	120
Thiamin	1000	120
Vitamin B_{12}	20	0.24

Da Pyridoxal-5′-phosphat (PLP), die aktive Form des Pyridoxins (Vitamin B_6) als Coenzym in Transaminasen eine Rolle spielt (Yoshimura *et al.*, 1996) und nicht in der KMVL vorhanden ist, sollte auch dieses Vitamin getestet werden. PLP sowie KMVL wurden daraufhin zusammen mit CAVF getestet. Doch weder die Vitaminlösung noch PLP zeigten einen mit CA vergleichbaren Effekt (Abbildung 3–30).

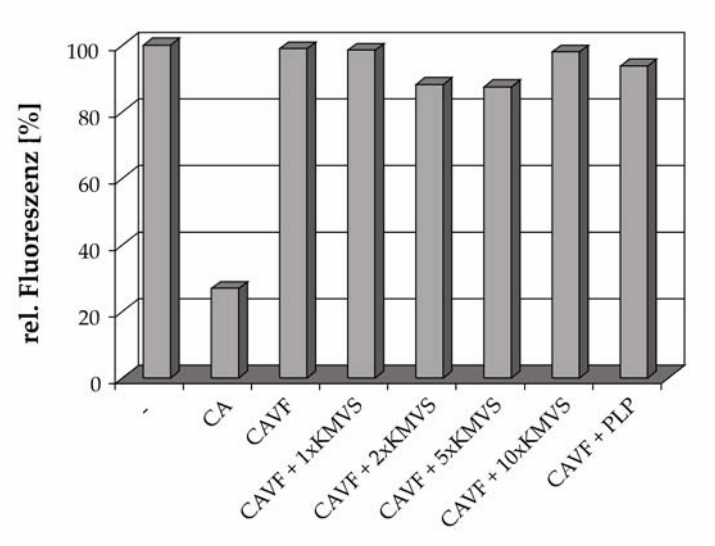


Abbildung 3-30: Einfluss der Kao & Michayluk 100x Vitamin Solution (KMVS) und Pyridoxal-5-phosphat (PLP) auf die Expression von *eGFP* in *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 in VK2-Medium. Die spezifische Fluoreszenz (100 µl Kultur mit 0,3 OD_{600}) wurde in drei unabhängigen Experimenten nach jeweils 24 h gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Standardabweichung betrug weniger als 10 %. Die Normierung der Werte orientiert sich am Mittelwert der Fluoreszenz nach 24 h in VK2-Medium mit SEL [-].

3.6.4 Einfluss der Transkriptionsfaktoren CodY und TnrA

Da CodY außer durch GTP auch durch die Bindung der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAAs) wie Valin, Leucin und Isoleucin aktiviert wird (Shivers und Sonenshein, 2004), und diese drei Aminosäuren auch in den CAs vorkommen, könnte CodY für den CA-Effekt verantwortlich sein. Zusammen mit GlnR spielt auch der Transkriptionsfaktor TnrA eine entscheidende Rolle bei der globalen Regulation des Stickstoffhaushalts in *B. subtilis* (Wray, Jr. *et al.*, 1996) und könnte damit ebenfalls zum CA-Effekt beitragen. Ein Alignment der Konsensus-Bindestellen dieser beiden Regulatoren mit den Promotorregionen von P_{manP} bzw. P_{manR} zeigte allerdings keine Übereinstimmungen. Um herauszufinden, welchen Einfluss eine Inaktivierung dieser beiden Regulatoren auf den CA-Effekt haben könnte, wurden zunächst die Gene *codY* bzw. *tnrA* im Genom von *B. subtilis* deletiert.

Für die Deletion von *tnrA* wurden zunächst jeweils ca. 1kb der flankierenden Regionen per PCR amplifiziert (s7243/s7244 bzw. s7245/s7246) und über eine 3-Fragment-Ligation in den temperatursensitiven Integrationsvektor pMW521.1 gebracht (pMW745.5). Mithilfe von pMW745.5 wurde *tnrA* in *B. subtilis* 3NA deletiert. Anschließend wurde durch Transformation dieses Stamms mit dem Integrationsvektor pSUN356.7 *manP* durch das Erythromycinresistenzgen *ermC* ersetzt und der Stamm MWZ 16 (*spo0A3* Δ*manP::ermC* Δ*tnrA*) erhalten. Die Deletion von *tnrA* wurde über PCR überprüft (s7243/s7246).

Als nächstes wurde *codY* im Genom von *B. subtilis* 3NA deletiert. Da mithilfe des Systems mit dem temperatursensitiven Vektor pMW521.1 keine richtigen Klone erhalten werden konnten, wurde das *mrpS/loxP*-System verwendet (Warth und Altenbuchner, 2013): Dazu wurden zunächst die flankierenden Regionen von *codY* über PCR amplifiziert (s7599/s7515 bzw. s7600/s7517). Als Zielvektor wurde pMW513.3 gewählt, ein pIC20HE-Derivat mit Erythromycinresistenzgen flankiert von *mrpS/loxP* Erkennungssequenzen. Dieser Vektor wurde ursprünglich für die Deletion der Biosynthesegene für das 3,3'-Neotrehalosadiamin-Antibiotikum (*ntdABC-glcP*) von *B. subtilis* konstruiert. Erst wurde die stromabwärts gelegene Region von *codY* in pMW513.3 gebracht (pMW828.2), und anschließend die stromaufwärts gelegene Region in pMW828.2 (pMW830.6). Für die Gegenselektion wurde mit *aad9* ein Spectinomycin-Resistenzgen in pMW830.6 gebracht (pMW831.1; Plasmidkarte s. Anhang). Durch Transformation von *B. subtilis* 3NA mit pMW831.1 wurde *codY* durch ein Erythromycinresistenzgen ersetzt. Dieser Stamm wurde anschließend mit dem instabilen Expressionsvektor pJOE6732.1 transformiert, der das Gen für die P1-Cre-Rekombinase trägt (Plasmidkarte s. Anhang). Durch die gebildete Rekombinase wurde das Erythromycinresistenzgen unter Zurücklassen einer hybriden *mroxP* Sequenz wieder aus dem Genom entfernt. Aufgrund seiner hohen Instabilität ging pJOE6732.1 wieder verloren. Durch Deletion von *manP* mithilfe des Integrationsvektors pSUN356.7 wurde der Stamm MWZ 34 (*spo0A3* Δ*manP::ermC* Δ*codY*) erhalten. Die Deletion von *codY* wurde über PCR bestätigt (s7599/s7517).

Die *B. subtilis* Stämme MWZ 16, MWZ 34 sowie TQ356 als Kontrolle wurden mit dem *eGFP*-Expressionsvektor pMW168.1 transformiert. Die Transformanten wurden in VK2-Medium ohne SEL angezogen und anschließend in VK2-Medium mit SEL überimpft. Zur Kontrolle wurde VK2-Medium mit SEL und CA verwendet. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C (Schüttler, 200 rpm) wurde die spezifische Fluoreszenz gemessen (Abbildung 3–31). Die OD_{600} lag bei allen Kulturen zwischen 1,5 und 2,0. Während die *tnrA* Deletion keinen Einfluss hatte, bewirkte die Deletion von *codY* im Vergleich zum Referenzstamm eine etwas geringere Expression in VK2 ohne CA. Mit CA war die *eGFP*-Expression allerdings stärker ausgeprägt. Die *codY* Deletion scheint demnach den CA-Effekt umzukehren.

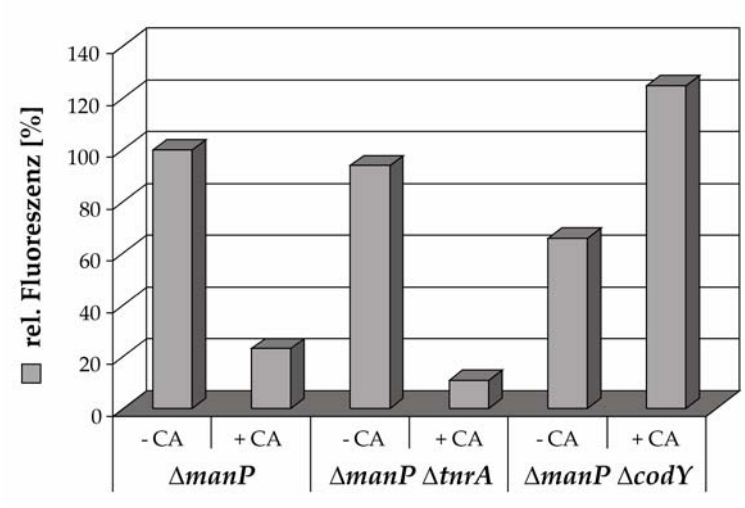


Abbildung 3-31: Einfluss der Deletion von *tnrA* (*B. subtilis* MWZ 16 pMW168.1) und *codY* (*B. subtilis* MWZ 34 pMW168.1) auf die Fluoreszenz in VK2-Medium. Als Kontrolle wurde *B. subtilis* TQ356 pMW168.1 (*spo0A3 ΔmanP::ermC*) verwendet. Die spezifische Fluoreszenz (100 µl Kultur mit 0,3 OD_{600}) wurde in drei unabhängigen Experimenten nach jeweils 16 h gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Standardabweichung betrug weniger als 10 %. Die Normierung der Werte orientiert sich am Mittelwert der Fluoreszenz nach 16 h in VK2-Medium mit *B. subtilis* TQ356 pMW168.1.

Um herauszufinden, ob CodY trotz fehlender Konsensussequenz an die P_{manP}- bzw. P_{manR}-Promotorregionen bindet, wurde *codY* über PCR amplifiziert (s8454/s8455) und durch Klonierung in pSUN390.1 mit einem C-terminalen His_6-Affinitätstag versehen (pMW1037.2; s. Anhang). Die Überexpression erfolgte in *E. coli* JM109.

CodY-His$_6$ wurde aufgereinigt (ca. 95% Reinheit) und in Gelmobilityshift Assays eingesetzt (Abbildung 3–32). Um die Aktivität von CodY zu gewährleisten wurden zusätzlich die Cofaktoren GTP, Isoleucin und Valin (je 1 mM) zugegeben (Joseph *et al.*, 2005). Als Negativkontrolle diente ein P_{merR}-Fragment aus *Streptomyces lividans* 1326 (Rother *et al.*, 1999), als Positivkontrolle ein P_{ilvB}-Fragment (Cy5-s8822/s8824) aus *B. subtilis* 3NA, welches eine CodY-Bindestelle trägt (Molle *et al.*, 2003).

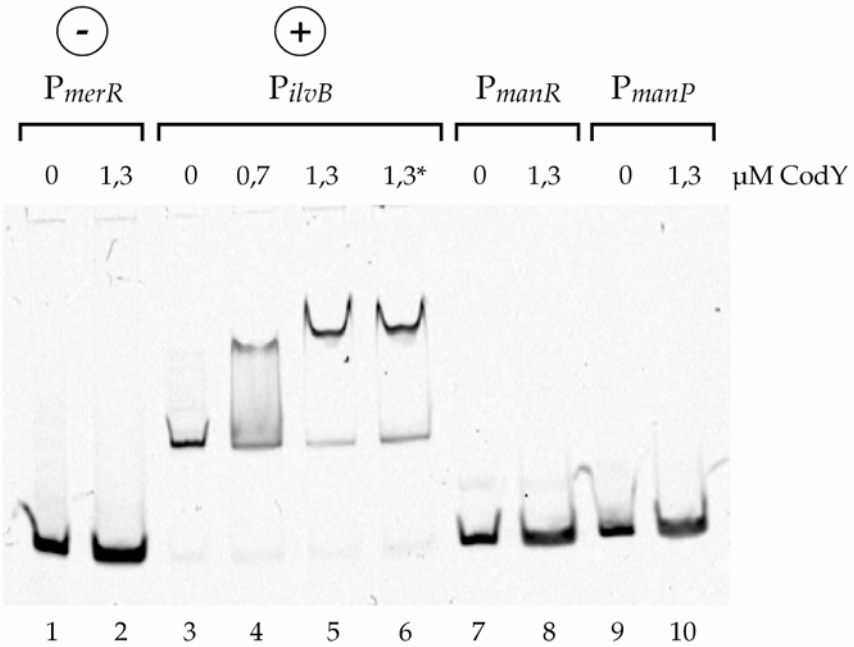


Abbildung 3-32: Wechselwirkung von CodY mit P_{manR} bzw. P_{manP}. Gelmobilityshift Assay mit jeweils 5 nM Cy5-markierten DNA-Fragmenten, gereinigtem CodY-His$_6$ in angegebener Konzentration und jeweils 1 mM GTP, Isoleucin und Valin. Spurbelegung: **1-2**, Negativkontrolle (P_{merR}-Fragment aus *S. lividans* 1326); **3-6** Positivkontrolle (P_{ilvB}-Fragment aus *B. subtilis* 3NA, [*] Spur **6** ohne GTP, Isoleucin und Valin); **7-8**, P_{manR}-Fragment aus *B. subtilis* 3NA; **9-10**, P_{ilvB}-Fragment aus *B. subtilis* 3NA.

Bei der Positivkontrolle (P_{ilvB}; Spur 3-6) wurde nach Zugabe von CodY-His$_6$ eine Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit beobachtet. Die Negativkontrolle (P_{merR}; Spur 1-2) sowie die Fragmente mit P_{manR} (Spur 7-8) bzw. P_{manP} (Spur 9-10) zeigten dies nicht. Interessanterweise führte das Weglassen der Cofaktoren zu keiner signifikanten Änderung im Wanderungsverhalten. Möglicherweise wurde CodY bereits bei der Produktion in *E. coli* in einen aktiven Zustand versetzt und in eben diesem auch aufgereinigt.

3.7 Hefeextrakt als günstige Induktoralternative?

Da Mannose mit einem derzeitigen Marktwert von ca. 1 € pro Gramm als relativ teurer Induktor angesehen werden kann, wurde nach kostengünstigeren Alternativen gesucht. Beispielsweise sind Hefen für ihren hohen Anteil an D-Mannose bekannt. Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* macht D-Mannose bis zu 16 % des Zelltrockengewichts aus (Falcone und Nickerson, 1956). Neben mannosylierten Proteinen und Mannan kommt in Hefen auch das in der Zellwand befindliche Polysaccharid Glucomannan (GM) vor (Kessler und Nickerson, 1959), welches aus *β*-1,4-verknüpften D-Mannose und D-Glucose Monomeren aufgebaut ist (Alonso-Sande *et al.*, 2009; Maeda *et al.*, 1980). Der im LB-Medium verwendete Hefeextrakt (BD Bacto™ Yeast Extract) weist einen Kohlenhydratanteil von 163,3 mg g^{-1} auf und wird nach Angaben des Herstellers aus *S. cerevisiae* gewonnen: Beim Herstellungsprozess werden die Hefezellen schonend autolysiert, um die B-Vitamine zu erhalten. Die wasserlösliche Fraktion wird ultrafiltriert und ergibt das Endprodukt. Dabei werden die unlöslichen Komponenten inklusive der Zellwandbestandteile zum größten Teil abgetrennt; nur ca. 1 % der unlöslichen Fraktion gelangt als Kontamination in die lösliche Fraktion (Otero *et al.*, 1996).

3.7.1 Hefeextrakt zeigt nur schwach induzierende Wirkung

Um zu zeigen, ob und welchen Einfluss Hefeextrakt auf die Genexpression ausgehend von P_{manP} besitzt, wurde Bactotrypton-Medium (BT-Medium) verwendet, welches LB ohne Hefeextrakt entspricht. In diesem Medium wurde *B. subtilis* 3NA pMW168.1 angezogen und nach 2 h Wachstum bei 37°C mit 0,5 % (w/v) D-Mannose bzw. 0,5 % (w/v) Hefeextrakt - entsprechend der Menge in LB-Medium - induziert und weiter bei 37°C inkubiert. Nach 2, 4, 6 und 24 h wurde die spezifische Fluoreszenz bestimmt (Abbildung 3–33A).

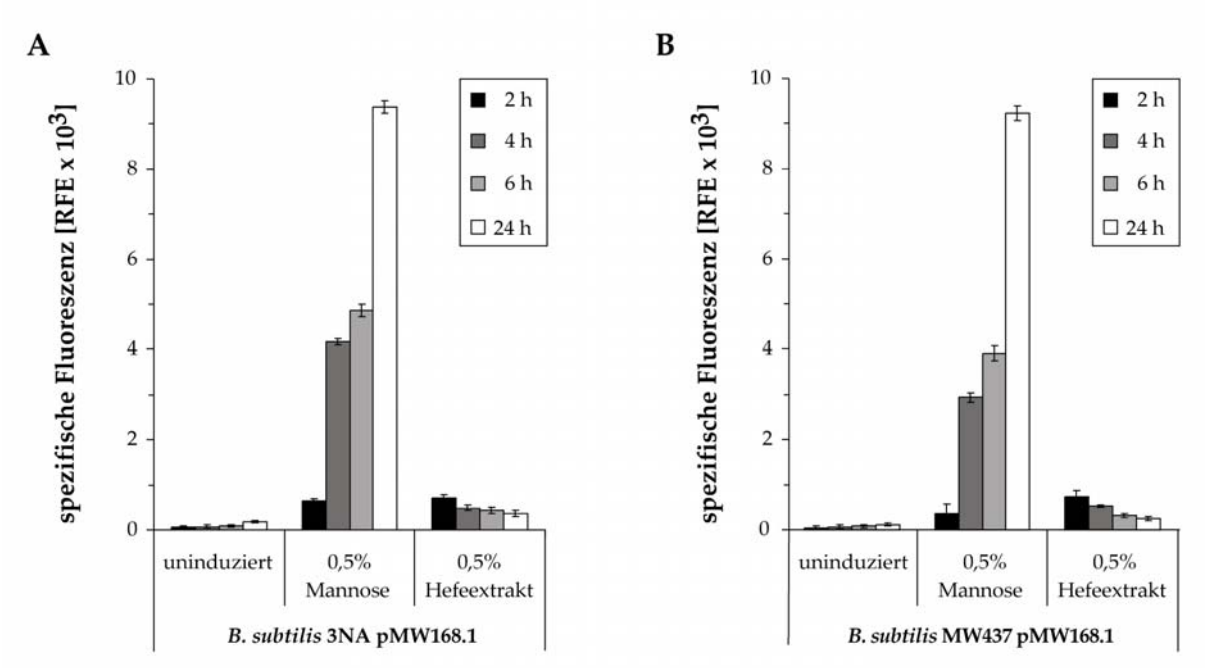


Abbildung 3-33: Einfluss des Hefeextrakts auf die Expression von *eGFP* mit (A) *B. subtilis* 3NA pMW168.1 (P_{manP}-*eGFP*) und (B) *B. subtilis* MW437 pMW168.1 in BT-Medium. Die spezifische Fluoreszenz (100 µl Kultur mit 0,3 OD_{600}) wurde nach 2, 4, 6 und 24 h bestimmt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung als Fehlerbalken.

Mit Mannose konnte bereits nach 4 h Induktion eine deutliche Fluoreszenz beobachtet werden. Im Vergleich wurde nach der gleichen Zeit mit Hefeextrakt nur etwa 10 % der Fluoreszenzaktivität erreicht. Diese stieg mit Mannose weiter an, mit Hefeextrakt nahm sie hingegen stetig wieder ab. Die spezifische Wachstumsrate μ_{max} in BT-Medium wurde durch Zugabe des Hefeextrakts um ca. 30 % gesteigert. Der pH-Wert blieb während der Versuchsreihe konstant bei etwa 7,0.

3.7.2 Inaktivierung der Mannanase GmuG

Die schwach induzierende Wirkung des Hefeextrakts lässt sich entweder auf freie oder gebundene Mannose-Moleküle zurückführen. Wie bereits erwähnt, können beim Herstellungsprozess auch Spuren von Glucomannan (GM) in den Hefeextrakt gelangen. Die für den Abbau von GM notwendigen Proteine sind im *gmuBACDREFG* Operon codiert (Kunst *et al.*, 1997; Sadaie *et al.*, 2008). Tabelle 3–11 gibt eine Übersicht der einzelnen Gene des *gmu* Operons und der jeweils codierten Proteine.

Tabelle 3-11: Übersicht der Gene des *gmu* Operons in *B. subtilis*.

Accession #	Name	Länge (bp)	Koordinaten	Beschreibung
BSU05810	*gmuB*	312	626622..626933	Oligo-α-mannosid PTS EIIB
BSU05820	*gmuA*	333	626933..627265	Oligo-α-mannosid PTS EIIA
BSU05830	*gmuC*	1329	627284..628612	Oligo-α-mannosid PTS EIIC
BSU05840	*gmuD*	1398	628630..630027	Mannosid-phospho-β-D-Glucosidase
BSU05850	*gmuR*	714	630170..630883	Transkriptionsregulator (GntR Familie)
BSU05860	*gmuE*	900	630912..631811	mutmaßliche Carbohydrat-Kinase
BSU05870	*gmuF*	948	631808..632755	Phosphohexomutase (Cupin-Familie)
BSU05880	*gmuG*	1089	632774..633862	exportierte endo-1,4-β-Mannanase

Da die exportierte Mannanase GmuG beim Abbau von GM und Mannobiose (Man-β-1,4-Man) eine wesentliche Rolle spielt (Sadaie *et al.*, 2008), könnte dieses Enzym neben GM auch mannosylierte Seitenketten der Hefeproteine als Substrat erkennen. Demzufolge müsste sich der Einfluss des Hefeextrakts auf die Expression des *man* Operons durch die Deletion von *gmuG* verändern, sofern Spuren von GM oder mannosylierten Peptiden im Hefeextrakt vorhanden sind. Um die letzten vier Gene des *gmu* Operons (*gmuREFG*) markerlos zu deletieren, wurden jeweils ca. 1 kb der flankierenden Regionen über PCR amplifiziert (s5996/s5997 bzw. s5998/s5999) und über 3-Fragment-Ligation in den temperatursensitiven Vektor pMW521.1 gebracht. *B. subtilis* 3NA wurde mit dem resultierenden Integrationsvektor pMW437.1 transformiert und nach weiteren Schritten die gewünschten Gene deletiert. Der entstandene Stamm MW437 wurde daraufhin mit pMW168.1 transformiert. Jeweils drei der Transformanten wurden einem Wachstumstest in BT-Medium unterzogen und mit 0,5% (w/v) D-Mannose bzw. 0,5% (w/v) Hefeextrakt induziert. Die spezifische Fluoreszenz wurde nach 2, 4, 6 und 24 h gemessen und miteinander verglichen (s. Kapitel 3.7.1; Abbildung 3–33B). Die spezifische Wachstumsrate μ_{max} wurde durch den Hefeextrakt um ca. 20% gesteigert, während der pH-Wert bei etwa 7,0 konstant blieb. *B. subtilis* MW437 pMW168.1 zeigte im Vergleich zu *B. subtilis* 3NA pMW168.1 bei Induktion mit Mannose jedoch kaum Unterschiede im Expressionsverhalten. Hingegen nahm mit Hefeextrakt das Expressionsniveau mit fortschreitender Inkubationsdauer etwas stärker ab als bei *B. subtilis* 3NA pMW168.1.

4 Diskussion

Charakterisierung von ManR - Regulation und DNA-Bindeeigenschaften

Der Transkriptionsaktivator ManR von *B. subtilis* reguliert die Expression der Gene des Mannose-Operons *manPA-yjdF* und seines eigenen Gens *manR* (Sun und Altenbuchner, 2010). Für die Charakterisierung wurde *manR* sowohl in *B. subtilis* als auch in *E. coli* überexprimiert. Zwar konnte ManR in *B. subtilis* als aktives Protein gewonnen werden, eine Aufreinigung war jedoch nicht möglich. Western Blots zeigten, dass die am C-Terminus von ManR verwendeten Affinitätstags in *B. subtilis* degradiert werden. Eine Aufreinigung von ManR war somit nur nach Produktion in *E. coli* möglich. ManR konnte allerdings nur in geringer Konzentration (ca. 0,15 g l^{-1}) gewonnen und nicht weiter aufkonzentriert werden. Dies deutet darauf hin, dass ManR bei höherer Konzentration aggregiert. Tatsächlich wurden nach Induktion der *manR* Expression in *E. coli* und auch in *B. subtilis* hohe Anteile der produzierten ManR-Moleküle in der unlöslichen Fraktion gefunden.

Wie für viele andere PRD-haltige Regulatoren gezeigt werden konnte, wird deren Aktivität durch spezifische Phosphorylierung bestimmter konservierter Aminosäure-reste über HPr bzw. den jeweiligen PTS-Transporter (EII) reguliert (Deutscher *et al.*, 2006). Da auch ManR diese konservierten Aminosäurereste besitzt, wurde aufgrund der hohen Analogie zu MtlR aus *G. stearothermophilus* und *B. subtilis* (Henstra *et al.*, 2000; Heravi *et al.*, 2011; Joyet *et al.*, 2010) vermutet, dass die Aktivität von ManR ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert wird. Tatsächlich ist bei Verwendung von P_{manR} und P_{manP} eine Induktion mit Mannose nicht möglich, wenn der Stamm eine HPr-His15Ala Mutation trägt, die eine Phosphorylierung der PRD2 und damit eine Aktivierung von ManR verhindert (Sun und Altenbuchner, 2010). Da aber auch *E. coli* über ein PTS mit EI und HPr verfügt, könnte man annehmen, dass ManR auch in *E. coli* phosphoryliert und aktiviert werden kann. In *E. coli* produziertes ManR zeigte jedoch nur eine sehr geringe Aktivität, da im Gelmobilityshift Assay jedoch nur ein geringer Teil der DNA eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit zeigte. Deshalb ist davon auszugehen, dass das HPr aus *E. coli* das heterologe ManR nur

unzureichend phosphoryliert, und damit hauptsächlich nur inaktives Protein produziert wird.

Prinzipiell reagiert das Mannose-Expressionssystem auf drei Situationen:

(i) Ohne Mannose als Kohlenstoffquelle zeigt sich eine Basalexpression.

(ii) Mit Mannose wird die Expression ausgehend von P_{manR} und P_{manP} induziert.

(iii) Mit Mannose und der bevorzugten Kohlenstoffquelle Glucose findet eine Katabolitrepression statt.

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten kann das in Abbildung 4–1 gezeigte Modell für die Regulation der ManR-Aktivität postuliert werden.

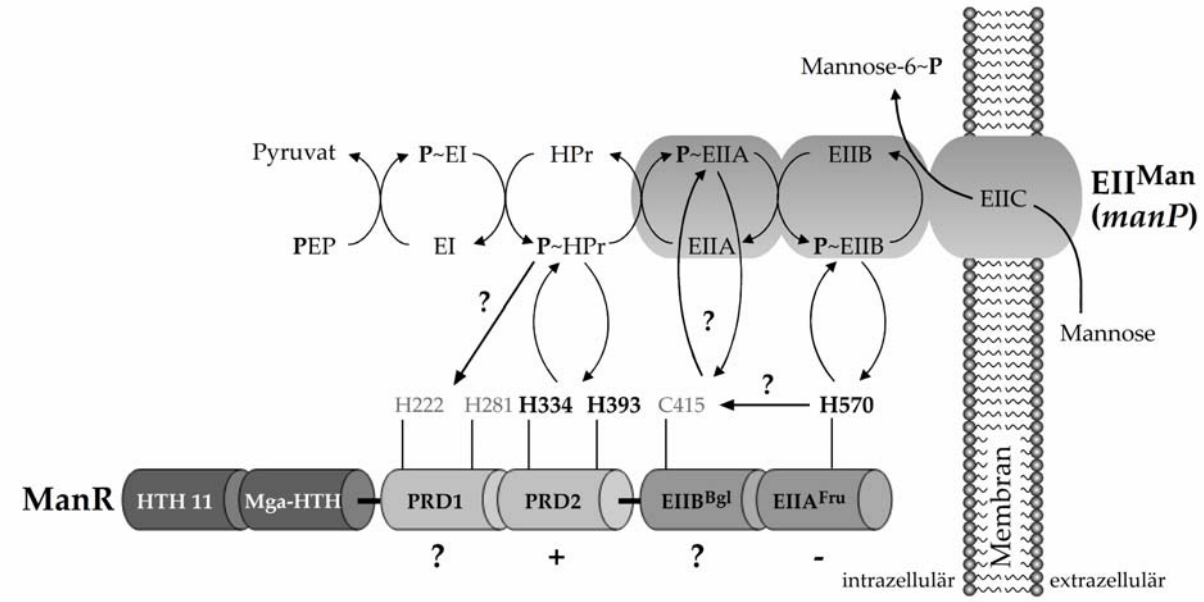


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des *B. subtilis* Mannose-spezifischen PTS und das vorgeschlagene Regulationsmodell der ManR-Aktivierung über Phosphorylierung (verändert nach Wenzel und Altenbuchner, 2013). In Abwesenheit von Glucose stimuliert HPr-His-15~P die Aktivität von ManR durch Phosphorylierung der PRD2. In Anwesenheit von Glucose phosphoryliert HPr-His-15~P EII^{Glc} (nicht gezeigt), die PRD2 wird durch HPr dephosphoryliert und ManR inaktiviert. Eine Phosphorylierung der PRD1 scheint nicht essentiell für die ManR-Aktivität zu sein, kann aber nicht ausgeschlossen werden. In Anwesenheit von Mannose sind $EIIB^{Bgl}$ und $EIIA^{Fru}$ dephosphoryliert, die PRD2 phosphoryliert und ManR in einem aktiven Zustand. Ist keine Mannose vorhanden, werden $EIIB^{Bgl}$ und $EIIA^{Fru}$ durch EII^{Man} phosphoryliert und ManR damit inaktiviert. Cys-415 wird entweder intermolekular durch $EIIA^{Man}$~P oder intramolekular von His-570~P phosphoryliert.

Für die Aktivierung von ManR durch Phosphorylgruppenübertragung von PEP, EI und HPr scheinen die konservierten Histidine der PRD2 zwingend erforderlich zu sein, da deren Austausch zu Alanin zu einem vollständigen Verlust der DNA-Bindeeigenschaften von ManR führt. Mutationen in der PRD1 haben keinen so deutlichen Effekt. His-570 in der $EIIA^{Fru}$-Domäne von ManR wurde als Hauptziel der negativen Regulation durch Phosphorylierung über $EIIB^{Man}$ identifiziert. Die äquivalenten His-598 von *G. stearothermophilus* MtlR und His-599 von *B. subtilis* MtlR wurden ebenfalls als Ziel der Phosphorylierung durch die entsprechenden PTS-Transporter (EII^{Mtl}) identifiziert (Henstra *et al.*, 2000; Joyet *et al.*, 2010). In *B. subtilis* spielt neben His-599 das Cys-419 eine ebenso wichtige Rolle bei der negativen Regulation von MtlR (Joyet *et al.*, 2010). Während die MtlR-Cys419Ala-Mutation zu einer vollständig konstitutiven Expression führt, wurde mit der äquivalenten ManR-Cys415Ala-Mutante nur eine erhöhte Basalaktivität festgestellt. Im Vergleich zeigt die His570Ala-Mutation in ManR einen viel stärkeren Effekt als die Cys415Ala-Mutation. Nur mit der Cys415Ala/His570Ala-Doppelmutante konnte eine vollständige Konstitutivität beobachtet werden. Anscheinend sind beide Aminosäuren bei der negativen Regulation durch EII^{Man} wichtig, wobei His-570 die wichtigere Rolle spielt. Da die ManR-His570Ala-Mutante außerdem nicht durch $EIIA^{Man}$ bzw. $EIIB^{Man}$ inaktiviert werden konnte, ist es naheliegend, dass die Phosphorylierung von Cys-415 nicht ausreichend ist, um die DNA-Bindeeigenschaften von ManR zu reduzieren. Nimmt man allerdings an, dass die Phosphorylgruppenübertragung auf Cys-415 ausschließlich von His-570 aus erfolgt, so kann in der His570Ala-Mutante der Einfluss von Cys-415 auf die Aktivität von ManR nicht beurteilt werden. Weiterhin muss man in Betracht ziehen, dass die Cys415Ala/His570Ala-Doppelmutation mit einem starken Verlust der Gesamtaktivität einherging und damit zu Fehlinterpretationen führen kann.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei MtlR von *B. subtilis*, die zeigten, dass der Regulator nur durch zusätzliche Bindung an den PTS-Transporter aktiviert werden kann (Bouraoui *et al.*, 2013), ist EII^{Man} nicht für die Aktivierung von ManR notwendig. Die Inaktivierung des Gens für den PTS-Transporter (*manP*) führt zu einer konstitutiven Expression (Sun und Altenbuchner, 2010). Auch die Deletion der

EIIA^{Fru}-Domäne von ManR führt zu einem vollständig konstitutiven Verhalten, da ManR nicht mehr durch Phosphorylierung durch den PTS-Transporter inaktiviert werden kann. Allerdings geht auch diese Mutation mit einem hohen Verlust der Gesamtaktivität einher. Die gemeinsame Deletion der EIIB- und EIIA-ähnlichen Domänen von ManR führte zu einem Totalverlust der Aktivität von ManR, da in dieser Form vermutlich keine Dimerisierung mehr stattfinden kann.

Einziger Schwachpunkt des vorgeschlagenen Modells ist der Austausch der konservierten Histidine in den PRDs durch Alanin, der stets mit einem mehr oder weniger starken Verlust der β-Galaktosidase-Aktivität als Reporter einhergeht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies durch eine fehlerhafte Faltung von ManR hervorgerufen wird. Im Gegensatz zu MtlR von *B. subtilis* (Joyet *et al.*, 2010) hat eine Phosphomimikry durch den Austausch der konservierten Aminosäurereste durch Aspartat in ManR nicht funktioniert, da die Ergebnisse der Asp-Mutanten denen der Ala-Mutanten stark ähneln. Wie auch bei anderen PRD-haltigen Regulatoren von *B. subtilis* (Charrier *et al.*, 1997; Joyet *et al.*, 2010; Tortosa *et al.*, 2001) konnten keine dauerhaft aktiven ManR Moleküle gewonnen werden, um das Regulationsmodell weiter zu untermauern. Des Weiteren können *in vivo* zwei isomere Formen von Phosphohistidin (pHis) auftreten, nämlich π(pros)-pHis und τ(tele)-pHis (Attwood *et al.*, 2007). Da nicht bekannt ist, welche dieser Formen für die Aktivität von ManR verantwortlich ist, kann dadurch eine Phosphomimikry durch Aspartat oder Glutamat erschwert werden. Da π-pHis unter schwach basischen Bedingungen zu τ-pHis isomerisieren kann (Hultquist, 1968), könnte dessen Auftreten *in vivo* aber auch nur ein Artefakt aufgrund der Proteinisolations- und Aufreinigungsprozesse sein.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang der Nachweis jedes einzelnen Phosphorylierungsereignisses von ManR. Allerdings ist die Phosphoramidat-ähnliche Bindung von pHis sehr energiereich und besonders unter sauren Bedingungen sehr instabil (Wei und Matthews, 1991). Damit verursachen bereits standardmäßige, unter sauren Bedingungen ablaufende Arbeitsabläufe in der Proteomanalyse ziemliche Probleme, wie z.B. die Proteinfällung durch Trichloressigsäure. Auch während der Ionisation bei massenspektrometrischen Analysen verliert pHis sehr leicht seine

Phosphorylgruppe. Viele Ansätze wurden unternommen, um diesen Problemen beizukommen. Die zu untersuchenden Proteine wurden dabei jedoch meist *in vitro* phosphoryliert, wodurch es wiederum zu unspezifischen Phosphorylierungen kommen kann und somit den tatsächlichen Phosphorylierungsgrad *in vivo* nicht unbedingt wiedergibt (Kee und Muir, 2012).

Die Bindestellen von ManR (Operatoren) in den beiden Promotorregionen P_{manR} und P_{manP} wurden durch Sequenzanalysen und DNase I Footprinting Experimente identifiziert. Sie überlappen mit den jeweiligen -35-Regionen. Diese Lage spricht für einen Aktivierungsmechanismus der Klasse II, d.h. ManR rekrutiert wahrscheinlich die RNA-Polymerase durch Interaktion mit der σ Untereinheit. Die Bindung von ManR an die Operatoren von P_{manR} und P_{manP} führte jedoch zu einem unterschiedlichen Schutz der beiden Stränge vor dem DNase I Abbau. Während ManR auf beiden Strängen der P_{manP}-Region und auf dem nicht-codierenden Strang der P_{manR}-Region eine Sequenz von etwa 50 bp Länge vor dem DNase I Abbau schützt, wurde nur die linke Hälfte der entsprechenden Region auf dem codierenden Strang der P_{manR}-Region vor dem Abbau geschützt. Da die Halbwertszeiten der ManR-DNA-Komplexe für die beiden Regionen jedoch ähnlich hoch sind, ist dieses Verhalten unerwartet. Geht man davon aus, dass ManR wie z.B. LicT als Dimer an die Operatoren bindet (Declerck *et al.*, 2001; Graille *et al.*, 2005), könnten die beiden Monomere aufgrund der vorhandenen Sequenzunterschiede ungleiche Affinitäten für die jeweilige Hälfte der Operatoren besitzen. Solch ein Verhalten wurde beispielsweise für den Transkriptionsregulator CsdR von *Pseudoalteromonas piscicida* beobachtet (Miyamoto *et al.*, 2007). Unterschiedliche Affinitäten zu Operatorhälften bzw. asymmetrische Bindungen sind bei multimeren Regulatoren nicht ungewöhnlich, so ist dies z.B. beim tetrameren CggR Repressor von *B. subtilis* (Zorrilla *et al.*, 2007) oder beim tetrameren LacI Repressor von *E. coli* zu beobachten (Kalodimos *et al.*, 2002). Des Weiteren besitzen beide Stränge der von ManR geschützten DNA-Regionen exponierte Bereiche, die bevorzugt von der DNase I geschnitten werden (hypersensitive Stellen). Diese deuten auf eine Biegung der DNA in diesem Bereich durch die Bindung von ManR hin. Möglicherweise wird die rechte

Hälfte des Operators in der P_{manR}-Region verstärkt exponiert und damit vollständig zum Substrat für die DNase I.

Um den oligomeren Zustand von aktivem ManR nachzuweisen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze verfolgt, die aufgrund des mangelnden Erfolgs nicht gezeigt wurden. Das ManR-Monomer hat ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa und einen pI von etwa 8,15. Um das native Molekulargewicht und damit den oligomeren Zustand dieses basischen Proteins nachzuweisen, wurden besondere Elektrophoresetechniken, wie z.B. die diskontinuierliche native Gelelektrophorese (Niepmann und Zheng, 2006) oder die Gelfiltration eingesetzt. Für die Analyse konnte allerdings nur das Proteingemisch aus ManR, EI und HPr eingesetzt werden, da angenommen wurde, dass ManR nur in seinem aktiven Zustand Dimere bildet. Aufgrund der nur geringen Konzentration an ManR und der Tatsache, dass EI (ca. 63 kDa) Dimere bildet (Zhu *et al.*, 1999) und im nativen Gel damit auf etwa gleicher Höhe laufen könnte wie mögliche ManR-Dimere, wurden keine klaren Ergebnisse erhalten, um eine definitive Aussage über das native Molekulargewicht treffen zu können. In den meisten Fällen trat ManR erst gar nicht in die Gelmatrix ein, und deutet auf eine Aggregation von ManR unter den gewählten Bedingungen hin. Eine kovalente Verknüpfung möglicher ManR-Dimere durch den Einsatz von DTSSP (3,3´-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat]) oder Glutaraldehyd führte selbst bei niedriger Dosierung der Crosslinker zu unlöslichen, hochmolekularen Agglomeraten.

Dagegen konnten die DNA-Bindeeigenschaften von ManR näher charakterisiert werden. Für die Aktivierung von ManR wurden die Bedingungen so gewählt, dass durch den molaren Überschuss an PEP, EI und HPr alle ManR-Moleküle phosphoryliert und damit aktiviert werden konnten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass einige ManR-Moleküle nur partiell oder gar nicht phosphoryliert wurden. Aus diesem Grund stellen die ermittelten K_D- und k_{diss}-Werte eher ein Minumum dar. Da der oligomere Zustand von ManR nicht bekannt war, wurde bei der Berechnung außerdem von ManR-Monomeren ausgegangen. Würde ManR als Dimer binden, würden sich die Werte entsprechend halbieren. Bei einer kooperativen Bindung zweier ManR-Monomere müssten für jedes einzelne die

Werte separat ermittelt werden. Bisher wurden für keinen der anderen PRD-haltigen Aktivatoren aus *B. subtilis* solche Werte definiert. Damit kann nur ein Vergleich mit den PRD-haltigen Antiterminatoren SacY und LicT aus *B. subtilis* vorgenommen werden, für welche die K_D-Werte auf 3 µM bzw. 10 nM bestimmt wurden (Declerck *et al.*, 1999; Declerck *et al.*, 2002). Transkriptionsregulatoren anderer Klassen von *B. subtilis* zeigen ähnliche Werte: So wurden K_D-Werte für TnrA und AlsR von 55 bzw. 33,5 nM in Bezug auf ihre jeweilige Operatorregion bestimmt (Frädrich *et al.*, 2012; Zalieckas *et al.*, 2006). Die für ManR ermittelten Werte liegen ebenfalls in diesem Bereich, womit ManR über keine außergewöhnlichen Bindeeigenschaften verfügt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls das geringere Expressionsniveau ausgehend von dem vermeintlich stärkeren Promotor P_{manR} geklärt werden: Dieses ist im Vergleich zur Expression mit dem Promotor P_{manP} auf eine weniger bevorzugte 5′-UTR zurückzuführen. Dies ist physiologisch gesehen sinnvoll, da das Regulatorprotein nicht in so hohem Maße gebildet werden muss, wie die Proteine für die Aufnahme und den Abbau von Mannose. Dennoch ist das Verhältnis der Expression von Regulatorgen zu den Operongenen relativ hoch. Die hohe chromosomale Expression von *manR* hat jedoch den Vorteil, dass selbst bei Verwendung von Expressionsvektoren mit hoher Kopienzahl die chromosomale Kopie ausreicht, um genügend ManR-Moleküle für die Bindung an sämtliche Operatoren der Vektoren zu bilden.

Während beim Mannitol System aus *B. subtilis* die Expression vom Promotor des Regulatorgens um das 130-fache geringer ausfällt als die Expression vom Operonpromotor, fällt die Expression von P_{manR} im Vergleich zu P_{manP} nur 4-fach geringer aus (Heravi *et al.*, 2011; Sun und Altenbuchner, 2010). Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten ist bisher ungeklärt, könnte aber möglicherweise mit der ungewöhnlichen Lage des Operators von MtlR zusammenhängen: Beim *mtl* Operon überlappt der Operator zwar nicht mit der -35-Region, besitzt aber auch einen kürzeren Abstand zur Bindestelle der RNA-Polymerase als bei Promotoren der Klasse I normal üblich (Heravi *et al.*, 2011). Der Aktivierungsmechanismus von MtlR ist in diesem Fall also nicht eindeutig, und evtl. deshalb auch nicht so wirkungsvoll wie der von ManR.

Das selbstinduzierende Expressionssystem für die Hochzelldichtefermentation

Das Mannose-induzierbare Expressionssystem für *B. subtilis* konnte erfolgreich in der Hochzelldichtefermentation für die Produktion des heterologen Reporterproteins eGFP angewendet werden (Wenzel, 2009; Wenzel *et al.*, 2011). Mit dem Standardsystem, d.h. Induktion durch Mannose, wurden ähnlich hohe Werte wie mit einem vergleichbaren Xylose-induzierbaren System in *B. megaterium* erzielt, bei dem - allerdings unter Verwendung von Antibiotika - eine Produktausbeute $Y_{P/X}$ von 3,7% erzielt wurde (Stammen *et al.*, 2010). Der Nachteil des Standardsystems liegt jedoch in der schnellen Umsetzung des Induktors Mannose, der in der Hierarchie nach Glucose und Fructose, aber noch vor Sorbitol (Glucitol), zu den bevorzugten Kohlenstoffquellen von *B. subtilis* gehört (Singh *et al.*, 2008). Da der aktuelle Preis für Mannose relativ hoch ist, ist das Standardsystem für eine industrielle Produktion nicht wirtschaftlich genug, da selbst eine exponentielle Zufütterung der Mannose nicht ausreicht, um konstant hohe Produktionsraten zu gewährleisten (Wenzel *et al.*, 2011). Aufgrund der Beobachtung, dass die Basalexpression von Genen unter Kontrolle von P_{manP} in LB-Medium etwas höher ist als in BT-Medium, wurde das Potential von Hefeextrakt, welcher den Unterschied zwischen den beiden Medien ausmacht, als günstigere Induktoralternative getestet. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass nur äußerst geringe Mengen an induzierenden Komponenten vorhanden sind, um hohe Expressionraten zu bekommen. Neben Glucomannan (β-1,4-Verknüpfung von D-Mannose und D-Glucose) kommen in der Zellwand der Hefe *S. cerevisiae* auch α-D-Mannane vor (Vinogradov *et al.*, 1998), die aufgrund ihrer Verknüpfung (α-1,2 und α-1,3) vermutlich kein Substrat für die Mannanase GmuG sind und daher auch nicht zur Induktion beitragen können.

Die durchgeführten Versuche zur Reduzierung des Mannose-Verbrauchs führten nicht zu dem gewünschten Erfolg. Die Inaktivierung der Mannose-6-phosphat-Isomerase bzw. die Reduzierung der Expression von *manA* führten zwar zu etwas geringeren Mengen an benötigtem Induktor, gingen jedoch mit einer Wachstums-inhibierung und morphologischen Veränderungen der Zellen einher. Letztere können durch eine intrazelluläre Akkumulation von Mannose-6-phosphat und dem damit hervorgerufenen osmotischen Stress erklärt werden. Durch die irreversible

Bindung von Phosphat an Mannose kann ein Phosphatmangel auftreten, der wiederum die Wachstumsinhibierung erklären könnte. Im Gegensatz zu allosterisch wirkenden Induktoren, wie IPTG, Rhamnose oder Arabinose, beruht der Aktivierungsmechanismus von ManR durch Mannose aber nicht durch die Bindung des Induktors an den Regulator, sondern auf Phosphorylgruppenübertragungen, die insbesondere bei der Aufnahme von Mannose durch das PTS ablaufen. Überraschenderweise zeigte der Δ*manA* Stamm in Schüttelkolbenexperimenten eine höhere Sensitivität gegenüber Mannose als in der Hochzelldichtefermentation. Möglicherweise kommt es in dem phosphatgepufferten Fermentationsmedium im Gegensatz zum ungepufferten LB-Medium nicht (so schnell) zu einem Phosphatmangel.

Nur wenige selbstinduzierende Expressionssysteme sind für *B. subtilis* entwickelt worden, wie z.B. das *pst* Operon, der *gsiB* Promotor und der Lysin-Riboswitch (Schumann, 2007). Diese wurden jedoch noch nicht in der Hochzelldichtefermentation erprobt. Weitere selbstinduzierende Systeme beruhen auf der Verwendung von Promotoren, die wachstums- oder stressbedingt durch alternative Sigmafaktoren aktiviert werden (Lee *et al.*, 2010; Schumann, 2007). Für *E. coli* wurden Systeme entwickelt, die auf einem diauxischen Wachstum der Zellen in Glucose- und Lactose-haltigem Medium beruhen (Blommel *et al.*, 2007; Studier, 2005; Urarte *et al.*, 2008). Ein anderes, bereits patentiertes System für *E. coli* basiert auf dem *lux* Regulon von *Vibrio fischeri* und reagiert durch Quorum Sensing auf die aktuelle Zelldichte, wodurch es erst bei hohen Zelldichten zur Induktion der Genexpression kommt (Nocadello und Swennen, 2012).

Basierend auf den Erkenntnissen über die Regulation des Mannosestoffwechsels in *B. subtilis* wurde ein selbstinduzierendes Expressionssystem entwickelt, welches keiner Induktion durch Mannose mehr bedarf. Die physiologischen Bedingungen während einer Fed-Batch-Fermentation und die Tatsache, dass ManR in einem Δ*manP* Stamm nicht mehr durch EII^{Man} inaktiviert werden kann (Sun und Altenbuchner, 2010), stellen die Rahmenbedingungen für dieses effektive System her. Während der Batch-Phase, in welcher hohe Glucosekonzentrationen im Bioreaktor vorherrschen, findet eine CCR durch Glucose statt, indem CcpA-HPr-Ser-46~P an die *cre*-Sequenz in der

P_{manR}-Promotorregion bindet und damit eine Expression ausgehend von P_{manR} und P_{manP} verhindert. Zusätzlich dephosphoryliert HPr die PRD2 von ManR und inaktiviert diesen dadurch. Tatsächlich konnte während der gesamten Batch-Phase keine Produktion von eGFP beobachtet werden. Sinkt die Glucose-Konzentration unter einen bestimmten Level, findet keine CCR mehr statt und ManR wird gebildet. Da EII^{Man} inaktiviert wurde, wird das gebildete ManR selbst bei Abwesenheit von Mannose nicht mehr durch Phosphorylierung seiner $EIIB^{Bgl}$- und $EIIA^{Fru}$-Domänen inaktiviert, sondern durch die weiterhin stattfindende Phosphorylierung der PRD2 durch HPr-His-15~P aktiviert. Damit wird mit dem Übergang in die Zufütterungsphase, in der zwar Glucose zugefüttert wird, im Bioreaktor jedoch netto keine Glucose vorliegt, die Expression von Genen gestartet, die unter der Kontrolle von P_{manR} bzw. P_{manP} stehen.

Bei der Anzucht der Vorkulturen konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von Spurenelementen und insbesondere Mn^{2+}-Ionen zu schnellerem Zellwachstum und höherer *eGFP* Expression führen. Das schnellere Wachstum bedeutet, dass auch Glucose schneller verbraucht wird. Die Zellen fallen damit schneller in Glucose-Limitation und haben vergleichsweise mehr Zeit, um eGFP zu produzieren. In erster Linie nutzt *B. subtilis* Mn^{2+} zwar zur Sporenbildung und -keimung (Charney *et al.*, 1951; Que und Helmann, 2000), im verwendeten Stamm ist durch eine Mutation im *spo0A* Gen jedoch keine Sporulation möglich. Als Cofaktor zahlreicher Enzyme und Proteine des Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus können Mn^{2+}-Ionen aber auch einen wachstumssteigernden Effekt besitzen (Jakubovics und Jenkinson, 2001), der auch hier beobachtet werden konnte.

Bei der Anzucht der Vorkulturen wurde außerdem festgestellt, dass durch Zugabe von CA die *eGFP* Expression vermindert wurde. Die frühe Zugabe von CA kann somit verhindern, dass die Zellen bereits in den Vorkulturen metabolischem Stress ausgesetzt sind, und Mutationen begünstigt werden. Dieser Effekt wurde systematisch anhand der Analysedaten der CA des Herstellers untersucht, führte allerdings zu keiner verständlichen Erklärung des Effekts. Ein Einfluss des Regulators CodY konnte zwar nachgewiesen werden, er bindet jedoch nicht an die P_{manR}- bzw. P_{manP}-Regionen selbst (Molle *et al.*, 2003; diese Arbeit). Die chromosomale

Deletion von *codY* resultierte neben einer Verschlechterung des Wachstums sogar im umgekehrten Effekt, indem nach Zugabe der CA eine höhere Expression beobachtet wurde. Interessant wäre demnach die Aufklärung, wie CodY beim CA-Effekt wirkt.

Die hohe Produktausbeute $Y_{P/X}$ von 14,6% blieb bis zum Ende der Fermentation konstant, obwohl durch Plasmidinstabilität eine starke Abnahme der plasmidtragenden Zellen festgestellt werden konnte. Plasmide wie das pUB110-Derivat pMW168.1, die nach dem Rolling-Circle-Mechanismus replizieren, sind bekannt dafür, einer stukturellen und segregativen Instabilität zu unterliegen (Bron *et al.*, 1988). Strukturelle Veränderungen in Form von Deletionen konnten bei pMW168.1 jedoch nicht nachgewiesen werden. Dafür war die segregative Instabilität von pMW168.1 mit *B. subtilis* TQ356 (*spo0A3* Δ*manP::ermC*) sowohl in LB- als auch im Fermentationsmedium sehr hoch. Dies kann durch die permanent hohe Expressionsrate von *eGFP* erklärt werden, die einen hohen metabolischen Stress für die Zellen darstellt. Der Austausch des pUB110- gegen das pBS72-Replicon, welches zu einer stabileren Replikation nach dem Theta-Mechanismus, aber auch zu einer deutlich geringeren Kopienzahl (von ca. 50 auf 5 Kopien pro Zelle) führt (Titok *et al.*, 2003), resultierte in einer signifikanten Verbesserung der segregativen Plasmidstabilität. Während sich Plasmide mit hoher Kopienzahl durch Diffusion in der Zelle verteilen und damit passiv an die Tochterzellen bei der Zellteilung weitergegeben werden, benötigen Plasmide mit niedriger Kopienzahl spezialisierte Partitionssysteme, um eine stabile und sichere Weitergabe an beide Tochterzellen zu gewährleisten. Solche Systeme, wie das ParA/ParB-System sind häufig auf Plasmiden mit niedriger Kopienzahl oder auf bakteriellen Chromosomen codiert (Bignell und Thomas, 2001). Auch in *B. subtilis* sind mit Soj und Spo0J, ParA- bzw. ParB-ähnliche Proteine vorhanden, die aber in erster Linie für die Segregation des Chromosoms verantwortlich sind (Lee und Grossman, 2006). Über welches System pBS72-Derivate auf die Tochterzellen verteilt werden, ist nicht bekannt. Aufgrund der niedrigen Kopienzahl des pBS72-Derivats pMW483.1 wurden in der Hochzelldichtefermentation mit *B. subtilis* TQ356 geringere Ausbeuten und Produktivitäten als mit dem pUB110-Derivat pMW168.1 erzielt. Die Erhöhung der Kopienzahl von pMW483.1 durch das Einbringen einer chromosomalen Kopie des Gens für das Replikations-

initiationsprotein RepA unter Kontrolle von P_{manP} steigerte zwar die Ausbeute und Produktivität, das Niveau, welches mit dem pUB110-Derivat erzielt wurde, konnte jedoch nicht erreicht werden. Dies lässt darauf schließen, dass weniger als 50 Kopien von pMW483.1 pro Zelle in diesem Stamm vorlagen. Da P_{manP} bereits ein relativ starker Promotor ist, ist eine weitere Steigerung der *repA* Expression und damit der Plasmidkopienzahl evtl. nur noch durch Verstärkung der episomalen *repA* Expression zu erreichen.

Die Verwendung der Alanin-Racemase als metabolischer Selektionsmarker zur Erhaltung der Plasmide wurde mehrfach beschrieben (Bron *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 1985; Nguyen *et al.*, 2011; Tauch *et al.*, 2002). Die Inaktivierung des *alrA* Gens, welches für *B. subtilis* essentiell ist (Kobayashi *et al.*, 2003), führt zur D-Alanin-Auxotrophie (Ferrari *et al.*, 1985), die auch in dieser Arbeit mit *alrA*$^-$ Stämmen beobachtet wurde. Die Einführung von Plasmiden mit *alrA* unter Kontrolle seines eigenen oder eines fremden Promotors stellt die D-Alanin-Prototrophie wieder her. Durch diesen Selektionsdruck wurden sie in Schüttelkolbenexperimenten zu 100% erhalten. Mit *alrB* (*yncD*) besitzt *B. subtilis* jedoch noch ein zweites Gen für eine Alanin-Racemase, dessen Expression durch eine sporadisch auftretende Suppressormutation aktiviert werden kann (Pierce *et al.*, 2008). Um *alrB* zu aktivieren ist es nicht zwangsläufig notwendig, dass die Mutation in der stromaufwärts von *alrB* gelegenen Region auftritt. Die Mutation kann auch an anderer Stelle in der Regulationskaskade auftreten (Pierce *et al.*, 2008). Auch in *E. coli* konnte eine zweite Alanin-Racemase-Aktivität durch eine Suppressormutation im *dadX* Gen festgestellt werden (Wijsman, 1972). Dieses Gen codiert für ein Enzym, das für den Metabolismus von L-Alanin zu Pyruvat und Ammonium über D-Alanin zuständig ist, und dessen Expression durch L-Alanin induziert wird (Wild *et al.*, 1985). Nicht alle Zellen des *B. subtilis alrA*$^-$ Stamms behielten die Fähigkeit eGFP zu produzieren. Dies lag einerseits an der strukturellen Instabilität des pUB110-basierten Vektors pMW972.2, bei dem die P_{manP}-*eGFP* Expressionskassette entweder teilweise oder ganz deletiert wurde. Andererseits müssen chromosomale Mutationen aufgetreten sein, da z.T. auch intakte Plasmide aus nicht-fluoreszierenden Klonen isoliert wurden. Das Vorhandensein von Suppressormutationen wurde bestätigt, indem die nicht-fluoreszierenden

Zellen für mehrere Generationen in Glucose-haltigem Medium (kein Selektionsdruck) angezogen wurden. Das anschließende Screening unter induzierenden Bedingungen zeigte keine Reversion des Phänotyps. Eine mögliche Aktivierung von *alrB* ist denkbar und wäre durch die zusätzliche Deletion von *alrB* in weiteren Experimenten zu überprüfen. Im Gegensatz zu den durchgeführten Schüttelkolbenexperimenten verloren die *B. subtilis alrA*$^-$ Zellen in der Zufütterungsphase der Hochzelldichtefermentation sehr schnell den Vektor. Durch die *alrA* Mutation kommt es bei *B. subtilis* generell sehr schnell zur Zelllyse, sobald kein D-Alanin mehr zur Verfügung steht (Ferrari *et al.*, 1985). Durch die zunehmenden Scherkräfte des Rührers könnte eine Zelllyse im Reaktor weiter begünstigt werden. Dadurch würde wiederum eine reichhaltige D-Alanin-Quelle in Form von zerstörten Zellwänden zur Verfügung gestellt werden, die den Selektionsdruck damit aufhebt.

Schlussfolgerung

Die profunden Erkenntnisse über den Transkriptionsaktivator ManR und die Katabolitrepression durch CcpA bzgl. der Regulation des Mannose Operons von *B. subtilis* (Sun und Altenbuchner, 2010; Wenzel und Altenbuchner, 2013) trugen dazu bei, ein neuartiges, selbstinduzierendes Expressionssystem für die Produktion heterologer Proteine in der Hochzelldichtefermentation zu entwickeln und auch zu verstehen (Wenzel *et al.*, 2011). Mit diesem System, welches bis zur technischen Reife optimiert und schließlich durch die Lonza Group AG (Visp, Schweiz) patentiert wurde[11], ist es möglich, hohe Ausbeuten und Produktivitäten bei Minimierung der Betriebskosten zu erreichen. Die Verbesserung der Vektorstabilität ohne Ausbeuteverluste stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar und bedarf weiterer Überlegungen und Experimente. Zukünftig gilt es zu zeigen, dass dieses System auch mit der Sekretion von Proteinen gekoppelt werden kann, um auch die Produktaufarbeitung zu erleichtern und damit weitere Prozesskosten zu sparen.

[11] International Patent WO2012/013710 / PCT/EP2011/062921
International Patent WO/2011/018377 / PCT/EP2010/061195

5 Literaturverzeichnis

Alonso-Sande, M., Teijeiro-Osorio, D., Remunán-López, C. und Alonso, M. J. (2009) Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *Eur. J Pharm. Biopharm.* **72**(2):453-462.

Altenbuchner, J., Viell, P. und Pelletier, I. (1992) Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. *Methods Enzymol.* **216:**457-466.

Anagnostopoulos, C. und Spizizen, J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**(5):741-746.

Arnaud, M., Debarbouille, M., Rapoport, G., Saier, M. H., Jr. und Reizer, J. (1996) *In vitro* reconstitution of transcriptional antitermination by the SacT and SacY proteins of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **271**(31):18966-18972.

Attwood, P. V., Piggott, M. J., Zu, X. L. und Besant, P. G. (2007) Focus on phosphohistidine. *Amino Acids* **32**(1):145-156.

Aymerich, S. und Steinmetz, M. (1992) Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**(21):10410-10414.

Bachem, S. und Stülke, J. (1998) Regulation of the *Bacillus subtilis* GlcT antiterminator protein by components of the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **180**(20):5319-5326.

Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Medigue, C. und Danchin, A. (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**(6):1758-1775.

Belitsky, B. R. und Sonenshein, A. L. (2008) Genetic and biochemical analysis of CodY-binding sites in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**(4):1224-1236.

Belitsky, B. R. und Sonenshein, A. L. (2011) Contributions of multiple binding sites and effector-independent binding to CodY-mediated regulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **193**(2):473-484.

Bergara, F., Ibarra, C., Iwamasa, J., Patarroyo, J. C., Aguilera, R. und Marquez-Magana, L. M. (2003) CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**(10):3118-3126.

Bertani, G. (1951) Studies on Lysogenesis .1. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**(3):293-300.

Bignell, C. und Thomas, C. M. (2001) The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J. Biotechnol.* **91**(1):1-34.

Blommel, P. G., Becker, K. J., Duvnjak, P. und Fox, B. G. (2007) Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of *lac* repressor dosage and medium composition. *Biotechnol. Prog.* **23**(3):585-598.

Bouraoui, H., Ventroux, M., Noirot-Gros, M. F., Deutscher, J. und Joyet, P. (2013) Membrane sequestration by the EIIB domain of the mannitol permease MtlA activates the *Bacillus subtilis mtl* operon regulator MtlR. *Mol. Microbiol.* **87**(4):789-801.

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:**248-254.

Brinsmade, S. R., Kleijn, R. J., Sauer, U. und Sonenshein, A. L. (2010) Regulation of CodY activity through modulation of intracellular branched-chain amino acid pools. *J. Bacteriol.* **192**(24):6357-6368.

Bron, P. A., Benchimol, M. G., Lambert, J., Palumbo, E., Deghorain, M., Delcour, J., De Vos, W. M., Kleerebezem, M. und Hols, P. (2002) Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(11):5663-5670.

Bron, S., Luxen, E. und Swart, P. (1988) Instability of recombinant pUB110 plasmids in *Bacillus subtilis*: plasmid-encoded stability function and effects of DNA inserts. *Plasmid* **19**(3):231-241.

Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. und Hobman, J. L. (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**(2-3):145-163.

Browning, D. F. und Busby, S. J. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(1):57-65.

Burkholder, P. R. und Giles, N. H. Jr. (1947) Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am. J. Bot.* **6:**345-348.

Chang, A. C. und Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**(3):1141-1156.

Charney, J., Fisher, W. J. und Hegarty, C. P. (1951) Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *J. Bacteriol.* **62**(2):145-148.

Charrier, V., Buckley, E., Parsonage, D., Galinier, A., Darbon, E., Jaquinod, M., Forest, E., Deutscher, J. und Claiborne, A. (1997) Cloning and sequencing of two enterococcal *glpK* genes and regulation of the encoded glycerol kinases by phosphoenolpyruvate-dependent, phosphotransferase system-catalyzed phosphorylation of a single histidyl residue. *J. Biol. Chem.* **272**(22):14166-14174.

Chattoraj, D. K. (2000) Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol. Microbiol.* **37**(3):467-476.

Chauvaux, S. (1996) CcpA and HPr(Ser-P): mediators of catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **147**(6-7):518-522.

Chen, I. und Dubnau, D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(3):241-249.

Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli* - transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**(7):2172-2175.

Cohn, F. (1872) Untersuchungen über Bakterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **1**(2):127-224.

Compton, S. J. und Jones, C. G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**(2):369-374.

Débarbouillé, M., Arnaud, M., Fouet, A., Klier, A. und Rapoport, G. (1990) The *sacT* gene regulating the *sacPA* operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators. *J. Bacteriol.* **172**(7):3966-3973.

Débarbouillé, M., Martin-Verstraete, I., Klier, A. und Rapoport, G. (1991) The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both σ^{54}- and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**(6):2212-2216.

Declerck, N., Dutartre, H., Receveur, V., Dubois, V., Royer, C., Aymerich, S. und van Tilbeurgh, H. (2001) Dimer stabilization upon activation of the transcriptional antiterminator LicT. *J Mol. Biol.* **314**(4):671-681.

Declerck, N., Minh, N. L., Yang, Y., Bloch, V., Kochoyan, M. und Aymerich, S. (2002) RNA recognition by transcriptional antiterminators of the BglG/SacY family: mapping of SacY RNA binding site. *J. Mol. Biol.* **319**(5):1035-1048.

Declerck, N., Vincent, F., Hoh, F., Aymerich, S. und van Tilbeurgh, H. (1999) RNA recognition by transcriptional antiterminators of the BglG/SacY family: functional and structural comparison of the CAT domain from SacY and LicT. *J. Mol. Biol.* **294**(2):389-402.

Deutscher, J., Francke, C. und Postma, P. W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**(4):939-1031.

Deutscher, J., Kessler, U., Alpert, C. A. und Hengstenberg, W. (1984) Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-Ser-HPr and its possible regulatory function? *Biochemistry* **23**(19):4455-4460.

Deutscher, J., Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V. und Hillen, W. (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**(6):1049-1053.

Deutscher, J., Reizer, J., Fischer, C., Galinier, A., Saier, M. H., Jr. und Steinmetz, M. (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**(11):3336-3344.

Deutscher, J. und Saier, M. H., Jr. (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**(22):6790-6794.

Doelle, H. W., Ewings, K. N. und Hollywood, N. W. (1982) Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. In *Microbial Reactions* Ed. Scheper, T. *et al.* S. 1-35.

Ebright, R. H. (1993) Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **8**(5):797-802.

Ehrenberg, C. G. (1835) Dritter Beitrag zur Erkenntnis großer Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Physikalische Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833-1835* S. 143-336.

Euzéby, J. P. (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**(2):590-592.

Fabret, C., Feher, V. A. und Hoch, J. A. (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**(7):1975-1983.

Falcone, G. und Nickerson, W. J. (1956) Cell-wall mannan-protein of baker's yeast. *Science* **124**(3215):272-273.

Ferrari, E., Henner, D. J. und Yang, M. Y. (1985) Isolation of an alanine racemase gene from *Bacillus subtilis* and its use for plasmid maintenance in *B. subtilis*. *Nat. Biotech.* **3**(11):1003-1007.

Frädrich, C., March, A., Fiege, K., Hartmann, A., Jahn, D. und Härtig, E. (2012) The transcription factor AlsR binds and regulates the promoter of the *alsSD* operon responsible for acetoin formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **194**(5):1100-1112.

Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A. und Murray, N. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**(4):827-842.

Fujita, Y. (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**(2):245-259.

Fujita, Y., Miwa, Y., Galinier, A. und Deutscher, J. (1995) Specific recognition of the *Bacillus subtilis gnt* cis-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol. Microbiol.* **17**(5):953-960.

Gajiwala, K. S. und Burley, S. K. (2000) Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**(1):110-116.

Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M. C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J. und Martin-Verstraete, I. (1997) The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**(16):8439-8444.

Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M. C., Deutscher, J. und Haiech, J. (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(4):1823-1828.

Gonzy-Tréboul, G., de Waard, J. H., Zagorec, M. und Postma, P. W. (1991) The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis* - Evidence for II^{Glc} and III^{Glc} Domains. *Mol. Microbiol.* **5**(5):1241-1249.

Graille, M., Zhou, C. Z., Receveur-Bréchot, V., Collinet, B., Declerck, N. und van Tilbeurgh, H. (2005) Activation of the LicT transcriptional antiterminator involves a domain swing/lock mechanism provoking massive structural changes. *J. Biol. Chem.* **280**(15):14780-14789.

Greenberg, D. B., Stülke, J. und Saier, M. H. (2002) Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Res. Microbiol.* **153**(8):519-526.

Gryczan, T. J., Hahn, J., Contente, S. und Dubnau, D. (1982) Replication and incompatibility properties of plasmid pE194 in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **152**(2):722-735.

Guerout-Fleury, A. M., Frandsen, N. und Stragier, P. (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**(1-2):57-61.

Hanson, K. G., Steinhauer, K., Reizer, J., Hillen, W. und Stülke, J. (2002) HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology* **148**(6):1805-1811.

Harrigan, G. G., Ridley, W. P., Miller, K. D., Sorbet, R., Riordan, S. G., Nemeth, M. A., Reeves, W. und Pester, T. A. (2009) The forage and grain of MON 87460, a drought-tolerant corn hybrid, are compositionally equivalent to that of conventional corn. *J. Agric. Food Chem.* **57**(20):9754-9763.

Henstra, S. A., Duurkens, R. H. und Robillard, G. T. (2000) Multiple phosphorylation events regulate the activity of the mannitol transcriptional regulator MtlR of the *Bacillus stearothermophilus* phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* **275**(10):7037-7044.

Heravi, K. M., Wenzel, M. und Altenbuchner, J. (2011) Regulation of *mtl* operon promoter of *Bacillus subtilis*: requirements of its use in expression vectors. *Microb. Cell Fact.* **10:**83.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**(1):51-59.

Hoch, J. A. (1993) Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47:**441-465.

Hochuli, E., Dobeli, H. und Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **411:**177-184.

Honjo, M., Nakayama, A., Iio, A., Mita, I., Kawamura, K., Sawakura, A. und Furutani, Y. (1987) Construction of a highly efficient host-vector system for secretion of heterologous protein in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **6**(3):191-204.

Hsu, R. L., Lee, K. T., Wang, J. H., Lee, L. Y. und Chen, R. P. (2009) Amyloid-degrading ability of nattokinase from *Bacillus subtilis* natto. *J. Agric. Food Chem.* **57**(2):503-508.

Hultquist, D. E. (1968) The preparation and characterization of phosphorylated derivatives of histidine. *Biochim. Biophys. Acta* **153**(2):329-340.

Idelson, M. und Amster-Choder, O. (1998) SacY, a transcriptional antiterminator from *Bacillus subtilis*, is regulated by phosphorylation *in vivo*. *J. Bacteriol.* **180**(3):660-666.

Itaya, M., Tsuge, K., Koizumi, M. und Fujita, K. (2005) Combining two genomes in one cell: stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**(44):15971-15976.

Jakubovics, N. S. und Jenkinson, H. F. (2001) Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology* **147**(7):1709-1718.

Janniere, L., Bruand, C. und Ehrlich, S. D. (1990) Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene* **87**(1):53-61.

Jault, J. M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J. und Galinier, A. (2000) The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J. Biol. Chem.* **275**(3):1773-1780.

Jeske, M. und Altenbuchner, J. (2010) The *Escherichia coli* rhamnose promoter $rhaP_{BAD}$ is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp-cAMP activation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**(6):1923-1933.

Jones, B. E., Dossonnet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J. und Klevit, R. E. (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol. Chem.* **272**(42):26530-26535.

Joseph, P., Ratnayake-Lecamwasam, M. und Sonenshein, A. L. (2005) A region of *Bacillus subtilis* CodY protein required for interaction with DNA. *J. Bacteriol.* **187**(12):4127-4139.

Joyet, P., Derkaoui, M., Poncet, S. und Deutscher, J. (2010) Control of *Bacillus subtilis mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR. *Mol. Microbiol.* **76**(5):1279-1294.

Kalodimos, C. G., Bonvin, A. M., Salinas, R. K., Wechselberger, R., Boelens, R. und Kaptein, R. (2002) Plasticity in protein-DNA recognition: *lac* repressor interacts with its natural operator *O1* through alternative conformations of its DNA-binding domain. *EMBO J.* **21**(12):2866-2876.

Kee, J. M. und Muir, T. W. (2012) Chasing phosphohistidine, an elusive sibling in the phosphoamino acid family. *ACS Chem. Biol.* **7**(1):44-51.

Kessler, G. und Nickerson, W. J. (1959) Glucomannan-protein complexes from cell walls of yeasts. *J. Chem. Technol. Biot.* **234:**2281-2285.

Kim, J. H., Voskuil, M. I. und Chambliss, G. H. (1998) NADP, corepressor for the *Bacillus catabolite* control protein CcpA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(16):9590-9595.

Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S. *et al.* (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(8):4678-4683.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. *et al.* . (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**(6657):249-256.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.

Le Blanc, D. J., Lee, L. N. und Inamine, J. M. (1991) Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**(9):1804-1810.

Lee, P. S. und Grossman, A. D. (2006) The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **60**(4):853-869.

Lee, S. J., Pan, J. G., Park, S. H. und Choi, S. K. (2010) Development of a stationary phase-specific autoinducible expression system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **149**(1-2):16-20.

Lee, S. Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **14**(3):98-105.

Lee, S. Y. und Rasheed, S. (1990) A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques* **9**(6):676-679.

Lindner, C., Galinier, A., Hecker, M. und Deutscher, J. (1999) Regulation of the activity of the *Bacillus subtilis* antiterminator LicT by multiple PEP-dependent, enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation. *Mol. Microbiol.* **31**(3):995-1006.

Lulko, A. T., Buist, G., Kok, J. und Kuipers, O. P. (2007) Transcriptome analysis of temporal regulation of carbon metabolism by CcpA in *Bacillus subtilis* reveals additional target genes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**(1-2):82-95.

Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J. V., Gnad, F., Kumar, C., Jensen, P. R. und Mann, M. (2007) The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell Proteomics.* **6**(4):697-707.

Maeda, M., Shimahara, H. und Sugiyama, N. (1980) Detailed examination of the branched structure of konjac glucomannan. *Agr. Biol. Chem.* **44**(2):245-252.

McIver, K. S. und Myles, R. L. (2002) Two DNA-binding domains of Mga are required for virulence gene activation in the group A streptococcus. *Mol. Microbiol.* **43**(6):1591-1601.

Michel, J. F. und Millet, J. (1970) Physiological studies on early-blocked sporulation mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* **33**(1):220-227.

Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Ming, Y. M., Wei, Z. W., Lin, C. Y. und Sheng, G. Y. (2010) Development of a *Bacillus subtilis* expression system using the improved P*glv* promoter. *Microb. Cell Fact.* **9:**55.

Miyamoto, K., Okunishi, M., Nukui, E., Tsuchiya, T., Kobayashi, T., Imada, C. und Tsujibo, H. (2007) The regulator CdsS/CdsR two-component system modulates expression of genes involved in chitin degradation of *Pseudoalteromonas piscicida* strain O-7. *Arch. Microbiol.* **188**(6):619-628.

Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y. und Sonenshein, A. L. (2003) Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J. Bacteriol.* **185**(6):1911-1922.

Moran, C. P., Jr., Lang, N., LeGrice, S. F., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A. L., Pero, J. und Losick, R. (1982) Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **186**(3):339-346.

Moszer, I., Jones, L. M., Moreira, S., Fabry, C. und Danchin, A. (2002) SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic Acids Res.* **30**(1):62-65.

Motejadded, H. und Altenbuchner, J. (2007) Integration of a lipase gene into the *Bacillus subtilis* chromosome: Recombinant strains without antibiotic resistance marker. *Iran. J. Biotechnol.* **5:**105-109.

Nakano, M. M., Dailly, Y. P., Zuber, P. und Clark, D. P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* **179**(21):6749-6755.

Nguyen, H. D., Nguyen, Q. A., Ferreira, R. C., Ferreira, L. C., Tran, L. T. und Schumann, W. (2005) Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid* **54**(3):241-248.

Nguyen, T. T., Mathiesen, G., Fredriksen, L., Kittl, R., Nguyen, T. H., Eijsink, V. G., Haltrich, D. und Peterbauer, C. K. (2011) A food-grade system for inducible gene expression in *Lactobacillus plantarum* using an alanine racemase-encoding selection marker. *J. Agric. Food Chem.* **59**(10):5617-5624.

Nickels, B. E., Dove, S. L., Murakami, K. S., Darst, S. A. und Hochschild, A. (2002) Protein-protein and protein-DNA interactions of σ^{70} region 4 involved in transcription activation by λcI. *J. Mol. Biol.* **324**(1):17-34.

Nicolas, P., Mäder, 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., Härtig, E., Harwood, C. R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M. *et al.* (2012) Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**(6072):1103-1106.

Niepmann, M. und Zheng, J. (2006) Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis* **27**(20):3949-3951.

Nocadello, S. und Swennen, E. F. (2012) The new pLAI (*lux* regulon based auto-inducible) expression system for recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **11:**3.

Olmos-Soto, J. und Contreras-Flores, R. (2003) Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**(4):369-373.

Otero, M. A., Vasallo, M. d. C. und Betancourt, D. (1996) A process for the complete fractionation of baker's yeast. *J. Chem. Technol. Biot.* **67**(1):67-71.

Park, Y. S., Kai, K., Iijima, S. und Kobayashi, T. (1992) Enhanced β-galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* **40**(6):686-696.

Pierce, K. J., Salifu, S. P. und Tangney, M. (2008) Gene cloning and characterization of a second alanine racemase from *Bacillus subtilis* encoded by *yncD*. *FEMS Microbiol. Lett.* **283**(1):69-74.

Piggot, P. J. und Hilbert, D. W. (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**(6):579-586.

Poon, K. K. H., Chen, C. L. und Wong, S. L. (2001) Roles of glucitol in the GutR-mediated transcription activation process in *Bacillus subtilis*: Tight binding of GutR to its binding site. *J. Biol. Chem.* **276**(13):9620-9625.

Presecan-Siedel, E., Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P. und Martin-Verstraete, I. (1999) Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**(22):6889-6897.

Que, Q. und Helmann, J. D. (2000) Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol. Microbiol.* **35**(6):1454-1468.

Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K. W. und Sonenshein, A. L. (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev.* **15**(9):1093-1103.

Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M. H. und Stülke, J. (1999) Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **145:**3419-3429.

Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., Karamata, D., Saier, M. H., Jr. und Hillen, W. (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* **27**(6):1157-1169.

Rose, R. E. (1988) The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* **16**(1):355.

Rother, D., Mattes, R. und Altenbuchner, J. (1999) Purification and characterization of MerR, the regulator of the broad-spectrum mercury resistance genes in *Streptomyces lividans* 1326. *Mol. Gen. Genet.* **262**(1):154-162.

Sadaie, Y., Nakadate, H., Fukui, R., Yee, L. M. und Asai, K. (2008) Glucomannan utilization operon of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**(1):103-109.

Sambrook, J., Fritsch,E.F. und Maniatis,T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**(12):5463-5467.

Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H. P., Manneberg, M., van Loon, A. P. und Bailey, J. E. (1996) Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(10):3687-3696.

Schein, C. H., Kashiwagi, K., Fujisawa, A. und Weissmann, C. (1986) Secretion of mature IFN-α-2 and accumulation of uncleaved precursor by *Bacillus subtilis* transformed with a hybrid α-Amylase signal sequence-IFN-α-2 Gene. *Nat. Biotechnol.* **4**(8):719-725.

Schilling, O., Langbein, I., Müller, M., Schmalisch, M. H. und Stülke, J. (2004) A protein-dependent riboswitch controlling *ptsGHI* operon expression in *Bacillus subtilis*: RNA structure rather than sequence provides interaction specificity. *Nucleic Acids Res.* **32**(9):2853-2864.

Schnetz, K., Stülke, J., Gertz, S., Kruger, S., Krieg, M., Hecker, M. und Rak, B. (1996) LicT, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator protein of the BglG family. *J. Bacteriol.* **178**(7):1971-1979.

Schumann, W. (2007) Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv. Appl. Microbiol.* **62:**137-189.

Serror, P. und Sonenshein, A. L. (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J. Bacteriol.* **178**(20):5910-5915.

Shewchuk, L. M., Verdine, G. L. und Walsh, C. T. (1989) Transcriptional switching by the metalloregulatory MerR protein: initial characterization of DNA and mercury (II) binding activities. *Biochemistry* **28**(5):2331-2339.

Shiloach, J. und Fass, R. (2005) Growing *E. coli* to high cell density - a historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.* **23**(5):345-357.

Shivers, R. P. und Sonenshein, A. L. (2004) Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Mol. Microbiol.* **53**(2):599-611.

Simonen, M. und Palva, I. (1993) Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* **57**(1):109-137.

Singh, K. D., Schmalisch, M. H., Stülke, J. und Görke, B. (2008) Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J. Bacteriol.* **190**(21):7275-7284.

Sonenshein, A. L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**(2):203-207.

Sonenshein, A. L. (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**(12):917-927.

Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**(10):1072-1078.

Stahmann, K. P., Revuelta, J. L. und Seulberger, H. (2000) Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**(5):509-516.

Stammen, S., Müller, B. K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E. und Jahn, D. (2010) High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(12):4037-4046.

Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**(1):207-234.

Stülke, J., Arnaud, M., Rapoport, G. und Martin-Verstraete, I. (1998) PRD - a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol. Microbiol.* **28**(5):865-874.

Stülke, J. und Hillen, W. (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54:**849-880.

Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. und Hiratani, H. (1990) Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* **84**(3):139-143.

Sun, T. (2009) Regulation des Mannose-Operons in *Bacillus subtilis*. Dissertation am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart. < http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2010/5249/ >.

Sun, T. und Altenbuchner, J. (2010) Characterization of a mannose utilization system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **192**(8):2128-2139.

Tauch, A., Götker, S., Pühler, A., Kalinowski, J. und Thierbach, G. (2002) The alanine racemase gene *alr* is an alternative to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains. *J. Biotechnol.* **99**(1):79-91.

Titok, M. A., Chapuis, J., Selezneva, Y. V., Lagodich, A. V., Prokulevich, V. A., Ehrlich, S. D. und Janniere, L. (2003) *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid* **49**(1):53-62.

Tobisch, S., Glaser, P., Krüger, S. und Hecker, M. (1997) Identification and characterization of a new β-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**(2):496-506.

Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K. und Fujita, Y. (2005) Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol. Microbiol.* **56**(6):1560-1573.

Tortosa, P., Declerck, N., Dutartre, H., Lindner, C., Deutscher, J. und Le Coq, D. (2001) Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and SacY. *Mol. Microbiol.* **41**(6):1381-1393.

Turinsky, A. J., Grundy, F. J., Kim, J. H., Chambliss, G. H. und Henkin, T. M. (1998) Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J. Bacteriol.* **180**(22):5961-5967.

Urarte, E., Auzmendi, I., Rol, S., Ariz, I., Aparicio-Tejo, P., Arredondo-Peter, R. und Moran, J. F. (2008) A self-induction method to produce high quantities of recombinant functional flavo-leghemoglobin reductase. *Methods Enzymol.* **436:**411-423.

van Dijl, J. M., Braun, P. G., Robinson, C., Quax, W. J., Antelmann, H., Hecker, M., Müller, J., Tjalsma, H., Bron, S. und Jongbloed, J. D. (2002) Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion. *J. Biotechnol.* **98**(2-3):243-254.

Vinogradov, E., Petersen, B. und Bock, K. (1998) Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy at 750 MHz. *Carbohydr. Res.* **307**(1-2):177-183.

Walsh, C. T. (1989) Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J. Biol. Chem.* **264**(5):2393-2396.

Wang, L. F., Hum, W. T., Kalyan, N. K., Lee, S. G., Hung, P. P. und Doi, R. H. (1989) Synthesis and refolding of human tissue-type plasminogen activator in *Bacillus subtilis*. *Gene* **84**(1):127-133.

Warner, J. B. und Lolkema, J. S. (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**(4):475-490.

Warth, L. und Altenbuchner, J. (2013) A new site-specific recombinase-mediated system for targeted multiple genomic deletions employing chimeric *loxP* and *mrpS* sites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi: 10.1007/s00253-013-4827.

Watanabe, S., Shiwa, Y., Itaya, M. und Yoshikawa, H. (2012) Complete sequence of the first chimera genome constructed by cloning the whole genome of *Synechocystis* strain PCC6803 into the *Bacillus subtilis* 168 genome. *J. Bacteriol.* **194**(24):7007.

Wegerer, A., Sun, T. Q. und Altenbuchner, J. (2008) Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnol.* **8:**2.

Wei, Y. F. und Matthews, H. R. (1991) Identification of phosphohistidine in proteins and purification of protein-histidine kinases. *Methods Enzymol.* **200:**388-414.

Weickert, M. J. und Adhya, S. (1992) A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* **267**(22):15869-15874.

Weinberg, Z., Wang, J. X., Bogue, J., Yang, J., Corbino, K., Moy, R. H. und Breaker, R. R. (2010) Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biol.* **11**(3):31.

Wenzel, M. (2009) Entwicklung und Optimierung von Expressionsvektoren für *Bacillus subtilis* und deren Anwendung in der Hochzelldichtefermentation. Diplomarbeit am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart.

Wenzel, M. und Altenbuchner, J. (2013) The *Bacillus subtilis* mannose regulator, ManR, a DNA-binding protein regulated by HPr and its cognate PTS transporter ManP. *Mol. Microbiol.* **88**(3):562-576.

Wenzel, M., Müller, A., Siemann-Herzberg, M. und Altenbuchner, J. (2011) Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(18):6419-6425.

Westers, L., Westers, H. und Quax, W. J. (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**(1-3):299-310.

Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., Deangelis, P. L., Weigel, P. H. und Brown, S. (2005) Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(7):3747-3752.

Wijsman, H. J. (1972) The characterization of an alanine racemase mutant of *Escherichia coli*. *Genet. Res.* **20**(3):269-277.

Wild, J., Hennig, J., Lobocka, M., Walczak, W. und Klopotowski, T. (1985) Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **198**(2):315-322.

Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M. und Altenbuchner, J. (2001) High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rha_{BAD} promoter. *Biotechnol. Bioeng.* **73**(2):95-103.

Wray, L. V., Jr., Ferson, A. E. und Fisher, S. H. (1997) Expression of the *Bacillus subtilis ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H. *J. Bacteriol.* **179**(17):5494-5501.

Wray, L. V., Jr., Ferson, A. E., Rohrer, K. und Fisher, S. H. (1996) TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(17):8841-8845.

Wray, L. V., Jr., Zalieckas, J. M. und Fisher, S. H. (2000) Purification and *in vitro* activities of the *Bacillus subtilis* TnrA transcription factor. *J. Mol. Biol.* **300**(1):29-40.

Wray, L. V., Jr., Zalieckas, J. M. und Fisher, S. H. (2001) *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell* **107**(4):427-435.

Wu, X. C., Lee, W., Tran, L. und Wong, S. L. (1991) Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J. Bacteriol.* **173**(16):4952-4958.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1):103-119.

Ye, R. Q. und Wong, S. L. (1994) Transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* glucitol dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.* **176**(11):3314-3320.

Yoshida, K., Yamaguchi, H., Kinehara, M., Ohki, Y. H., Nakaura, Y. und Fujita, Y. (2003) Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box. *Mol. Microbiol.* **49**(1):157-165.

Yoshimura, T., Jhee, K. H. und Soda, K. (1996) Stereospecificity for the hydrogen transfer and molecular evolution of pyridoxal enzymes. *Biosci. Biotechnol Biochem.* **60**(2):181-187.

Zakataeva, N. P., Nikitina, O. V., Gronskiy, S. V., Romanenkov, D. V. und Livshits, V. A. (2010) A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**(4):1201-1209.

Zalieckas, J. M., Wray, L. V., Jr. und Fisher, S. H. (2006) Cross-regulation of the *Bacillus subtilis glnRA* and *tnrA* genes provides evidence for DNA binding site discrimination by GlnR and TnrA. *J. Bacteriol.* **188**(7):2578-2585.

Zhu, P. P., Szczepanowski, R. H., Nosworthy, N. J., Ginsburg, A. und Peterkofsky, A. (1999) Reconstitution studies using the helical and carboxy-terminal domains of enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Biochemistry* **38**(47):15470-15479.

Zorrilla, S., Doan, T., Alfonso, C., Margeat, E., Ortega, A., Rivas, G., Aymerich, S., Royer, C. A. und Declerck, N. (2007) Inducer-modulated cooperative binding of the tetrameric CggR repressor to operator DNA. *Biophys. J.* **92**(9):3215-3227.

Zweers, J. C., Barak, I., Becher, D., Driessen, A. J., Hecker, M., Kontinen, V. P., Saller, M. J., Vavrova, L. und van Dijl, J. M. (2008) Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microb. Cell Fact.* **7:**10.

6 Anhang

6.1 Annotierte Sequenz des *man* Operons von *B. subtilis*

```
   1  agaaaatctt cgttctaaat aggtgaagaa ttggagtatt tttatgaatt tctgctgaat atacattaca tagcaaactc

                                 HindIII                                              PsiI
                                 -+-----                                            ---+--
  81  aaagagtata aaaatcgctt ttttccggaa gcttcggtaa aaaacgaaac ttttgtctct atgattttgt tttataatgt
                                  Operator                -35                        -10 cre

 161  aaacggtttc ttatatagta tacttatact atcaatttgc tcaagtagat actgacagga aggatagaaa aacagatgga
        +1   cre                                                      RBS
                                                                                  manR >>..>
                                                                                         m

 241  atacataaat acaagacaaa aagagatttt gtatctgttg ttatctgaac ctgatgacta tttagttgtg caagatttcg
      >.......................................manR.......................................>
      e  y  i  n   t  r  q   k  e  i   l  y  l  l   l  s  e   p  d  d   y  l  v  v   q  d  f

 321  cagatagggt acagtgttct gaaaaaacaa tccggaatga tttgaaagtg atcgaggatt atctcaatga gcattctcat
      >.......................................manR.......................................>
       a  d  r   v  q  c  s   e  k  t   i  r  n   d  l  k  v   i  e  d   y  l  n   e  h  s  h

                 BstBI                                                        BlpI
                --+---                                                      --+-----
 401  gcacagctta ttcgaaaacc agggttgggc gtttatttac atatagaaga acaggaaagg acctggctaa gccaacaatt
      >.......................................manR.......................................>
        a  q  l   i  r  k   p  g  l  g   v  y  l   h  i  e   e  q  e  r   t  w  l   s  q  q

 481  acatactgaa catttttctt ctaggcagcg gagcgataag gaaagaatgc tgcacattgc ttatgactta ttaatgaatc
      >.......................................manR.......................................>
      l  h  t  e   h  f  s   s  r  q   r  s  d  k   e  r  m   l  h  i   a  y  d  l   l  m  n

 561  cgaagcctgt ttccgcaaaa gacattgccg ctcggcattt tgtcaatcga tcttccatta aaaaggattt atacgcagta
      >.......................................manR.......................................>
       p  k  p   v  s  a  k   d  i  a   a  r  h   f  v  n  r   s  s  i   k  k  d   l  y  a  v

 641  gaagagtggc tgaagcgttt tgatctcaca ctggtttcta ggcagcggct tggattaaag gttgaaggga acgaaagaaa
      >.......................................manR.......................................>
        e  e  w   l  k  r   f  d  l  t   l  v  s   r  q  r   l  g  l  k   v  e  g   n  e  r

 721  taaaagaaag gcattggcaa gaatatctga tttgattcac aatacagcgt ttaccagcca atttattaaa agtaagtttt
      >.......................................manR.......................................>
      n  k  r  k   a  l  a   r  i  s   d  l  i  h   n  t  a   f  t  s   q  f  i  k   s  k  f

 801  tacattatga agtagacttt gtgacgaaag aaatcaaatc actacaaaaa aagcattccc tctatttcac agacgaaacg
      >.......................................manR.......................................>
       l  h  y   e  v  d  f   v  t  k   e  i  k   s  l  q  k   k  h  s   l  y  f   t  d  e  t

 881  tttgaaagtt tgttgctgca tacattgtta atggtccgcc gcatcaaaat gaagcagccg atttcattgt ccccaaaaga
                         H222
      >.......................................manR.......................................>
        f  e  s   l  l  l   h  t  l  l   m  v  r   r  i  k   m  k  q  p   i  s  l   s  p  k

                                                                          AgeI
                                                                         -+----
 961  aatggcggca gtaaaaaaga agaaagaata tcaatggaca tttgcttgtt tacagcggct tgaaccggtt tttgcaattc
      >.......................................manR.......................................>
      e  m  a  a   v  k  k   k  k  e   y  q  w  t   f  a  c   l  q  r   l  e  p  v   f  a  i

1041  gcttccctga agaagaagcc gtgtacttaa cattacatat attgggcggt aaggttcgtt atccattgca gacagaagag
                                        H281
      >.......................................manR.......................................>
       r  f  p   e  e  e  a   v  y  l   t  l  h   i  l  g  g   k  v  r   y  p  l   q  t  e  e

1121  aaccttgaaa atgctgtgct tcctaaggtt gtagggcatt taatcaatcg tgtttcagag ctgaaaatga tggattttca
      >.......................................manR.......................................>
        n  l  e   n  a  v   l  p  k  v   v  g  h   l  i  n   r  v  s  e   l  k  m   m  d  f
```

```
                    BclI                                          BlpI
                   -+----                                      --+-----
1201  caaggatcag gatttgatca atggtttgaa catt**cat**ctc aatactgtgc tacaacggct gagctacgat ctttctgtag
                                        H334
      >.......................................manR.......................................>
      h  k  d  q   d  l  i   n  g  l   n  i  h  l   n  t  v   l  q  r   l  s  y  d   l  s  v

1281  caaatcctat gctcaatgac atcaaaaaga tgtaccctta tttgttccac ctcatcattg atgttttgga agacatcaat
      >.......................................manR.......................................>
       a  n  p   m  l  n  d   i  k  k   m  y  p   y  l  f  h   l  i  i   d  v  l   e  d  i  n

1361  caaacttttg atcttcatat tcctgaggaa gaggcagcat atttgacatt g**cat**tttcag gcagcgatcg aacggatgca
                                                            H393
      >.......................................manR.......................................>
        q  t  f   d  l  h   i  p  e  e   e  a  a   y  l  t   l  h  f  q   a  a  i   e  r  m

                                                                          MunI
                                                                         -+----
1441  gggcagcagc gagacacata aaaaggcggt tatcgtc**tgc** cacatgggga ttgggatgtc acaattgctg cggacaaaaa
                                            C415
      >.......................................manR.......................................>
      q  g  s  s   e  t  h   k  k  a   v  i  v  c   h  m  g   i  g  m   s  q  l  l   r  t  k

1521  ttgaacggaa atatcaccaa atcgctgtaa tggcttgtat tgcaaaggcc gatttaaagg attatatcaa aaagcatgag
      >.......................................manR.......................................>
       i  e  r   k  y  h  q   i  a  v   m  a  c   i  a  k  a   d  l  k   d  y  i   k  k  h  e

1601  gatattgatc ttgtcatatc caccattgcg ctggagaata taacggttcc ccatattgtt gtgtctccgc ttttagagcc
      >.......................................manR.......................................>
        d  i  d   l  v  i   s  t  i  a   l  e  n   i  t  v   p  h  i  v   v  s  p   l  l  e

1681  tggcgaagag aagaaattaa gtgcgtttat acgtcagctg ggcgaatcac accgccaaaa acaaaaaacg tttcagatgc
      >.......................................manR.......................................>
      p  g  e  e   k  k  l   s  a  f   i  r  q  l   g  e  s   h  r  q   k  q  k  t   f  q  m

1761  tgaacaatac gactcctttt ttggtttttt tgcagcagga ggcggagcat cgctacaagt taatcgaaca gctggcgaca
      >.......................................manR.......................................>
       l  n  n   t  t  p  f   l  v  f   l  q  q   e  a  e  h   r  y  k   l  i  e   q  l  a  t

1841  gctttgtttg agaaaggcta tgttgataag gactatgcgg ttcatgcggt gatgagggaa aaaatgtcgg ctacaaatat
      >.......................................manR.......................................>
        a  l  f   e  k  g   y  v  d  k   d  y  a   v  h  a   v  m  r  e   k  m  s   a  t  n

1921  tgggtcaggc attgccattc ct**cat**gcaaa cgctaaattt attaaacaat cagcaatcgc gattgccaca ttaaaggagc
                             H570
      >.......................................manR.......................................>
      i  g  s  g   i  a  i   p  h  a   n  a  k  f   i  k  q   s  a  i   a  i  a  t   l  k  e

2001  cgcttgaatg gggaaatgaa aaagtttcgc tcgtttttat gctggctgtc aaacacgagg atcaaactat gacaaagcag
      >.......................................manR.......................................>
       p  l  e   w  g  n  e   k  v  s   l  v  f   m  l  a  v   k  h  e   d  q  t   m  t  k  q

                                         NgoMIV
                                         -+----
2081  ctgtttagcg agctttcata tcttagcgag cagccggcct tcgtccagaa gctgacgaaa gaaaccaatg tcatgacatt
      >.......................................manR.......................................>
        l  f  s   e  l  s   y  l  s  e   q  p  a   f  v  q   k  l  t  k   e  t  n   v  m  t

2161  tttatctcat ttggattatt **aaaagcaggg attattcctt gcttttttg** ttatagggaa aaatgccttt attaccggaa
                                        Terminator                                Operator
      >.........manR........>>
      f  l  s  h   l  d  y   -

                                                                  BglII
                                                                 -+----
2241  cctatggtaa aaaaagcg**at ttt**aatgagc tgatttcggt a**tacagt**tga gaca**a**gatct tattattcac actttaa**agg**
              Operator     -35                        -10         +1                          RBS

2321  **agg**tttccta tgaaactgtt agcgattaca tct**tgt**ccga atggaatcgc ccatacgtat atggcagcag aaaatctgca
      RBS                                   C9
               >>.....................................manP.....................................>
                  m  k  l   l  a  i  t   s  c  p   n  g  i   a  h  t  y   m  a  a   e  n  l

2401  aaaagctgct gacagactgg gcgttagcat caaagttgag acccagggag ggattggtgt tgaaaataag ctaaccgaag
      >.......................................manP.......................................>
      q  k  a  a   d  r  l   g  v  s   i  k  v  e   t  q  g   g  i  g   v  e  n  k   l  t  e
```

```
                                                                  AgeI
                                                                -+-----
2481  aggaaattcg cgaagcggac gcaatcatta ttgctgcaga ccgttcggta aacaaagacc ggtttatagg caaaaaactg
      >.......................................manP.......................................>
       e  e  i   r  e  a  d   a  i  i   i  a  a   d  r  s  v   n  k  d   r  f  i   g  k  k  l

                                                                                   AgeI
                                                                                 -+----
2561  ctgtctgtgg gggtacagga cggtatccgc aaaccggaag aattgattca aaaagctctt aacggggata taccggtcta
      >.......................................manP.......................................>
        l  s  v   g  v  q   d  g  i  r   k  p  e   e  l  i   q  k  a  l   n  g  d   i  p  v

2641  tcgttccgct acaaaatcgg aatccggtaa tcatcaggag aagaaacaaa atccaattta ccgtcattta atgaacggcg
      >.......................................manP.......................................>
      y  r  s  a   t  k  s   e  s  g   n  h  q  e   k  k  q   n  p  i   y  r  h  l   m  n  g

2721  tttcatttat ggttcctttc attgttgtcg gcggattatt gatagcggtt gcattaacgc ttggagggga gaaaacacct
      >.......................................manP.......................................>
       v  s  f   m  v  p  f   i  v  v   g  g  l   l  i  a  v   a  l  t   l  g  g   e  k  t  p

2801  aaaggcttag ttattccgga tgattccttc tggaaaacga ttgaacagat cggcagtgct tcattttcat ttatgattcc
      >.......................................manP.......................................>
        k  g  l   v  i  p   d  d  s  f   w  k  t   i  e  q   i  g  s  a   s  f  s   f  m  i

              NgoMIV
             -+-----
2881  gattttagcc ggctatatcg cctatagcat cgctgataaa ccggggcttg tgccaggtat gatcggcggt tatattgcgg
      >.......................................manP.......................................>
      p  i  l  a   g  y  i   a  y  s   i  a  d  k   p  g  l   v  p  g   m  i  g  g   y  i  a

                                     KasI
                                  --+----
2961  cgactggaag tttttatgac agcgcaagcg gcgccggatt cctcgggggg attattgccg ggtttttggc cggatacgcg
      >.......................................manP.......................................>
       a  t  g   s  f  y  d   s  a  s   g  a  g   f  l  g  g   i  i  a   g  f  l   a  g  y  a

3041  gcactttgga tcaaaaaatt aaaagttcca aaagccatcc agccgattat gccgattatt attattccgg tgtttgcatc
      >.......................................manP.......................................>
        a  l  w   i  k  k   l  k  v  p   k  a  i   q  p  i   m  p  i  i   i  i  p   v  f  a

3121  actgattgta ggtttagcgt ttgtgttttt gatcggcgcg cctgtagctc aaattttcgc ctctttaaca gtttggctgg
      >.......................................manP.......................................>
      s  l  i  v   g  l  a   f  v  f   l  i  g  a   p  v  a   q  i  f   a  s  l  t   v  w  l

3201  cggggatgaa agggtcgagc tcgatccttc tggcattgat tttaggggcg atgatctcat ttgatatggg cggtcccgta
      >.......................................manP.......................................>
       a  g  m   k  g  s  s   s  i  l   l  a  l   i  l  g  a   m  i  s   f  d  m   g  g  p  v

                                                                                MunI
                                                                              -+----
3281  aataaggtgg cgtttctgtt tggatcggca atgattggag aaggaaatta tgaaattatg ggaccaattg ctgtcgccat
      >.......................................manP.......................................>
        n  k  v   a  f  l   f  g  s  a   m  i  g   e  g  n   y  e  i  m   g  p  i   a  v  a

3361  ttgtatcccc ccgattggcc ttggcattgc gacgttttta ggaaaaagaa aattcgaggc a**tct**caaaga gaaatgggga
                                                                         S365
      >.......................................manP.......................................>
      i  c  i  p   p  i  g   l  g  i   a  t  f  l   g  k  r   k  f  e   a  s  q  r   e  m  g

3441  aagcggcatt tacgatgggg ctcttcggca ttactgaagg agcgattcca tttgcggcgc aggaccctct gcgcgttatt
      >.......................................manP.......................................>
       k  a  a   f  t  m  g   l  f  g   i  t  e   g  a  i  p   f  a  a   q  d  p   l  r  v  i

3521  ccaagtatta tggcaggctc aatgacaggt tctgtgatag ccatgattgg caatgtggga gacagagtgg cgcacggcgg
      >.......................................manP.......................................>
        p  s  i   m  a  g   s  m  t  g   s  v  i   a  m  i   g  n  v  g   d  r  v   a  h  g

                                     BclI
                                   -+-----
3601  acctatcgtt gcagtgcttg gcgcagttga tcatgtcttg atgtttttta ttgctgtgat tgcaggatct cttgtcactg
      >.......................................manP.......................................>
      g  p  i  v   a  v  l   g  a  v   d  h  v  l   m  f  f   i  a  v   i  a  g  s   l  v  t

3681  ctctgttcgt caatgtacta aaaaaggata ttacggcgtc tcctgtgctc agtgaaactg caccgacctc cgcgccaagt
      >.......................................manP.......................................>
       a  l  f   v  n  v  l   k  k  d   i  t  a   s  p  v  l   s  e  t   a  p  t   s  a  p  s
```

```
3761  gaagctgcgg cagcaaatga aataaagcag ccaattcaaa gccaaaaagc tgagatgtcg gaatttaaaa aactgacaga
      >.......................................manP.......................................>
        e  a  a   a  a  n   e  i  k  q   p  i  q   s  q  k   a  e  m  s   e  f  k   k  l  t

3841  cattatcagc ccggaattaa ttgaaccaaa tttatcgggg gaaacgagtg atgacatcat agatgaattg attcagaaat
      >.......................................manP.......................................>
      d  i  i  s   p  e  l   i  e  p   n  l  s  g   e  t  s   d  d  i   i  d  e  l   i  q  k

3921  tgtcacgaag aggtgcgctg ctttcagaga gcgggtttaa acaagccatt ttgaatcgtg aacaacaggg aacaacggcg
      >.......................................manP.......................................>
       l  s  r   r  g  a  l   l  s  e   s  g  f   k  q  a  i   l  n  r   e  q  q   g  t  t  a

4001  attggcatga atatcgcgat tccg**cac**gga aagtctgagg cggtcaggga gccgagtgtt gcctttggga tcaaacgatc
                                H566
      >.......................................manP.......................................>
        i  g  m   n  i  a   i  p  h  g   k  s  e   a  v  r   e  p  s  v   a  f  g   i  k  r

4081  aggcgttgat tggaatagcc tggatggatc agaagctaaa ttaatcttta tgattgctgt accgaaagag agcgggggaa
      >.......................................manP.......................................>
      s  g  v  d   w  n  s   l  d  g   s  e  a  k   l  i  f   m  i  a   v  p  k  e   s  g  g

4161  accagcatct caaaatactg cagatgctat ctcgaaagct aatggatgac aattataggg agcggctgct ctccgtgcaa
      >.......................................manP.......................................>
       n  q  h   l  k  i  l   q  m  l   s  r  k   l  m  d  d   n  y  r   e  r  l   l  s  v  q

4241  acaacagaag aagcatacaa gctgctagaa gaaatcgaat aaagcggggg attttcatga cgactgaacc gttatttttc
      >....................manP...................>>
        t  t  e   e  a  y   k  l  l  e   e  i  e   -
                                                                        >>.........manA..........>
                                                                          m   t  t  e   p  l  f  f

4321  aagcctgttt tcaaagaaag aatttggggc gggaccgctt tagctgattt tggctatacc attccgtcac aacgaacagg
      >.......................................manA.......................................>
        k  p  v   f  k  e   r  i  w  g   g  t  a   l  a  d   f  g  y  t   i  p  s   q  r  t

                                                                                      BlpI
                                                                                   --+----
4401  ggagtgctgg gcttttgccg cgcatcaaaa tggtcaaagc gttgttcaaa acggaatgta taaggggttc acgctcagcg
      >.......................................manA.......................................>
      g  e  c  w   a  f  a   a  h  q   n  g  q  s   v  v  q   n  g  m   y  k  g  f   t  l  s

4481  aattatggga acatcacaga catttattcg gacagcttga aggggaccgt ttccctctgc ttacaaaaat attagatgct
      >.......................................manA.......................................>
       e  l  w   e  h  h  r   h  l  f   g  q  l   e  g  d  r   f  p  l   l  t  k   i  l  d  a

4561  gaccaggact tatctgttca ggtgcatccg aatgatgaat atgccaacat acatgaaaac ggtgagcttg gaaaaacaga
      >.......................................manA.......................................>
        d  q  d   l  s  v   q  v  h  p   n  d  e   y  a  n   i  h  e  n   g  e  l   g  k  t

4641  atgctggtac attattgatt gccaaaaaga tgccgagatt atttatggcc acaatgcaac aacaaaggaa gaactaacta
      >.......................................manA.......................................>
      e  c  w  y   i  i  d   c  q  k   d  a  e  i   i  y  g   h  n  a   t  t  k  e   e  l  t

4721  ccatgataga gcgtggagaa tgggatgagc tcttgcgccg tgtaaaggta aagccggggg atttttcta tgtgccaagc
      >.......................................manA.......................................>
       t  m  i   e  r  g  e   w  d  e   l  l  r   r  v  k  v   k  p  g   d  f  f   y  v  p  s

                                 EcoRI
                               -+-----
4801  ggtactgttc atgcgattgg aaaaggaatt cttgctttgg agacgcagca gaactcagac acaacctaca gattatatga
      >.......................................manA.......................................>
        g  t  v   h  a  i   g  k  g  i   l  a  l   e  t  q   q  n  s  d   t  t  y   r  l  y

4881  ttatgaccga aaagatgcag aaggcaagct gcgcgagctt catctgaaaa agagcattga agtgatagag gtcccgtcta
      >.......................................manA.......................................>
      d  y  d  r   k  d  a   e  g  k   l  r  e  l   h  l  k   k  s  i   e  v  i  e   v  p  s

4961  ttccagaacg gcatacagtt caccatgaac aaattgagga tttgcttaca acgacattga ttgaatgcgc ttacttttcg
      >.......................................manA.......................................>
       i  p  e   r  h  t  v   h  h  e   q  i  e   d  l  l  t   t  t  l   i  e  c   a  y  f  s

                                    HindIII
                                    --+----
5041  gtggggaaat ggaacttatc aggatcagca agcttaaagc agcaaaaacc attccttctt atcagtgtga ttgaagggga
      >.......................................manA.......................................>
        v  g  k   w  n  l   s  g  s  a   s  l  k   q  q  k   p  f  l  l   i  s  v   i  e  g
```

```
                                                                NdeI
                                                              ---+---
5121  gggccgtatg atctctggtg agtatgtcta tcctttcaaa aaaggagatc atatgttgct gccttacggt cttggagaat
      >.......................................manA.......................................>
      e  g  r  m   i  s  g   e  y  v   y  p  f  k   k  g  d   h  m  l   l  p  y  g   l  g  e

5201  ttaaactcga aggatatgca gaatgtatcg tctcccatct gtaacatggc agggcttgag aaataaattt gcgagtgaag
      >.....................manA...................>>
       f  k  l   e  g  y  a   e  c  i   v  s  h   l  -

5281  acgcctattc tccagcaatg atctaaataa aataagagtt taatagttgg agaagaaatg ttacactctt ttctgtatat
                                                 Operator?

5361  ggtaaagaat gaaaaaacac gattcggttg gtagtccgga tgcatgattg agaatgtcag taaccttccc ctcctcggga

5441  tgtccatcat tctttaatat cttttat**gag gaggg**aatcg ttatgaaatt aacgatttac tacgatggtc agttttgggt
                                 RBS?
                                                >>.*yjdF* - C. Venter Pathema Datenbank[12].>
                                                  m  k   l  t  i  y   y  d  g   q  f  w

5521  aggcgttgtt gaagttgtgg acaatggaaa gctaagagcc tttcgtcatc tttttggcaa agagccgagg gattctgaag
      >.........................*yjdF* - C. Venter Pathema Datenbank.........................>
      v  g  v  v   e  v  v   d  n  g   k  l  r  a   f  r  h   l  f  g   k  e  p  r   d  s  e

                                                   BlpI
                                                 --+-----
5601  tattagagtt tgttcataac caacttttga atatgatggc ccaagctgag caggaaggag tgcgtttaca aggcaggcgt
      >.........................*yjdF* - C. Venter Pathema Datenbank.........................>
       v  l  e   f  v  h  n   q  l  l   n  m  m   a  q  a  e   q  e  g   v  r  l   q  g  r  r

5681  caaaaaaaga tcaatccaaa aagattgcag cgccaggttt caaaagagtt gaaaaacgcc ggagtaactt ctaaagctca
      >.........................*yjdF* - C. Venter Pathema Datenbank.........................>
        q  k  k   i  n  p   k  r  l  q   r  q  v   s  k  e   l  k  n  a   g  v  t   s  k  a

5761  agaggcgata aagctagagc ttgaagcaag aaagcaaaag aaaaaacaaa taatgaaaga acaacgagaa catgtaaaag
     >.........................*yjdF* - C. Venter Pathema Datenbank.........................>
      q  e  a  i   k  l  e   l  e  a   r  k  q  k   k  k  q   i  m  k   e  q  r  e   h  v  k

5841  agcaaaggta tatgctcaaa aagcaaaaag cgaaaaagaa gcacagaggt aaataatcca a**acaaaagca ggcgcagtgc**
                                                                                   Terminator
      >...........*yjdF* - C. Venter Pathema Datenbank............>>
       e  q  r   y  m  l  k   k  q  k   a  k  k   k  h  r  g   k  -

5921  **ctgctttgt** aattaaggac tctactttgt aacatatatc caatgtttat actccgctga tttatgattc aatataaacc
```

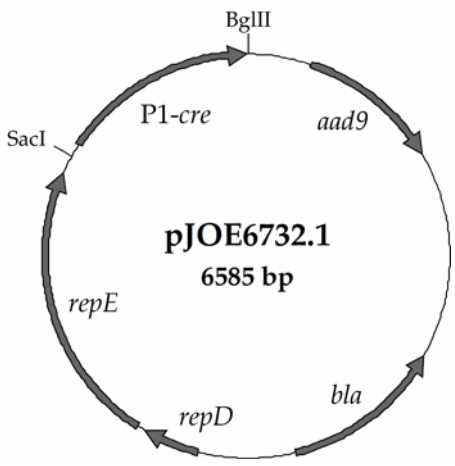
[12] http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Bacillus/PathemaHomePage.cgi

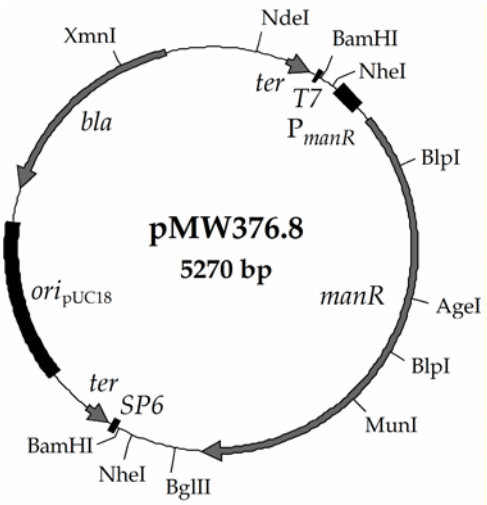
6.2 Analysedaten verschiedener Casein-Hydrolysate

Tabelle 6-1: Zusammensetzung der Casamino Acids (CA), Caseine Enzymatic Hydrolysate (CEH), Casitone und Trypton laut Hersteller (BD Bionutrients™ Technical Manual).

Komponente		CA	CEH	Casitone	Trypton
Kohlenhydrate	(mg g^{-1})	0,0	1,4	3,5	4,3
Asche	(%)	18,3	10,0	6,4	6,6
NaCl	(%)	12,1	0,0	0,0	0,0
Calcium	(µg g^{-1})	59,0	163,0	111,0	256,0
Eisen	(µg g^{-1})	1,3	2,8	23,5	23,0
Magnesium	(µg g^{-1})	143,0	49,0	213,0	195,0
Kalium	(µg g^{-1})	4098,0	1091,0	3480,0	3257,0
Natrium	(µg g^{-1})	88090,0	23923,0	34090,0	33910,0
Chlorid	(%)	6,7	0,3	0,1	6,0
Sulfat	(%)	0,6	0,1	0,4	0,3
Phosphat	(%)	2,6	0,6	2,5	2,6
Alanin	(% frei)	3,0	1,6	0,9	1,0
	(% gesamt)	3,0	2,7	3,4	3,2
Arginin	(% frei)	2,4	2,9	2,6	2,2
	(% gesamt)	2,5	5,1	2,8	5,0
Asparagin	(% frei)	0,0	1,6	0,5	0,6
Aspartat	(% frei)	0,7	1,1	0,2	0,4
	(% gesamt)	2,4	6,0	5,5	5,2
Cystin	(% frei)	0,1	2,4	0,0	0,3
Glutamat	(% frei)	15,1	3,6	0,9	1,4
	(% gesamt)	15,9	16,8	16,0	15,1
Glutamin	(% frei)	0,0	0,1	0,0	0,1
Glycin	(% frei)	1,4	0,5	0,2	0,2
	(% gesamt)	1,4	1,7	1,7	1,7
Histidin	(% frei)	0,2	1,3	0,4	0,5
	(% gesamt)	0,8	2,2	1,9	1,9
Isoleucin	(% frei)	3,1	2,5	1,1	1,3
	(% gesamt)	4,0	3,9	5,9	5,5
Leucin	(% frei)	4,6	6,8	4,7	4,8
	(% gesamt)	5,0	7,8	7,9	7,5
Lysin	(% frei)	2,1	5,4	4,5	5,5
	(% gesamt)	5,2	6,7	5,9	6,2
Methionin	(% frei)	1,4	2,3	1,1	1,0
	(% gesamt)*	1,4	2,7	2,2	2,1
Phenylalanin	(% frei)	3,4	3,5	2,7	3,0
	(% gesamt)	3,6	4,0	5,5	5,2
Prolin	(% frei)	7,5	1,1	0,3	0,2
	(% gesamt)	8,0	7,4	7,1	6,6
Serin	(% frei)	0,4	1,7	0,8	0,7
	(% gesamt)*	2,1	4,2	2,1	2,2
Threonin	(% frei)	0,5	2,0	0,5	0,7
	(% gesamt)	1,5	2,2	1,9	1,8
Tryptophan	(% frei)	0,0	7,2	0,8	0,8
Tyrosin	(% frei)	0,4	3,4	0,5	0,5
	(% gesamt)	0,4	3,6	1,6	1,3
Valin	(% frei)	4,7	3,1	1,3	1,7
	(% gesamt)	5,6	5,5	6,3	5,9

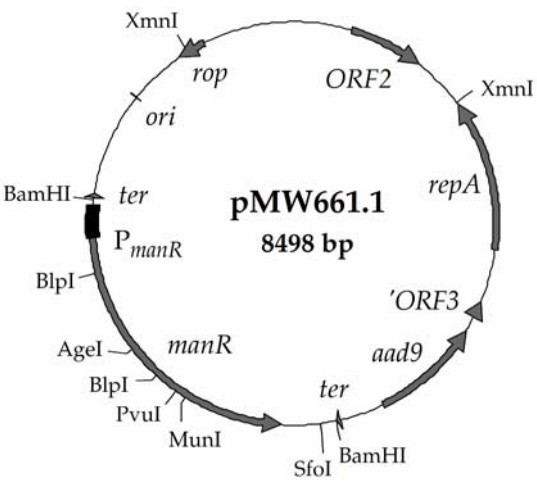
6.3 Plasmidkarten





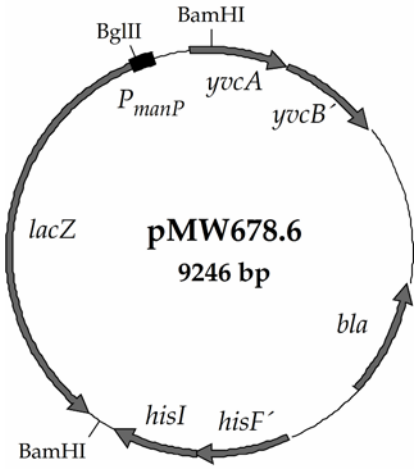
Derivate:

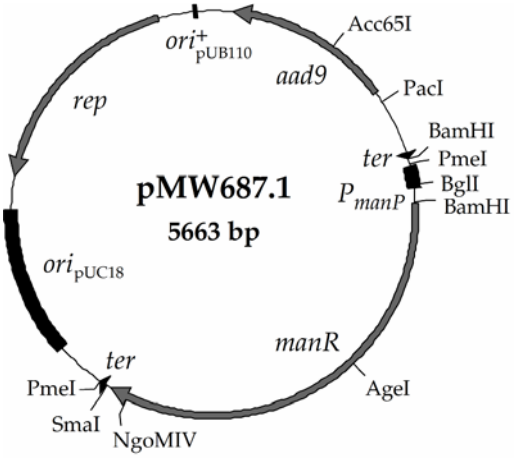
pMW401.1, pMW402.1, pMW403.1, pMW404.1, pMW407.1, pMW408.3, pMW420.1, pMW436.1, pMW467.1

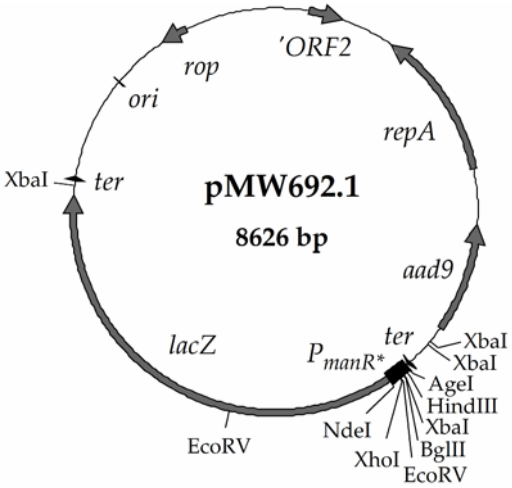


Derivate:

pMW662.6, pMW663.1, pMW664.1, pMW665.1, pMW666.1, pMW667.3, pMW668.3, pMW669.1, pMW670.1, pMW671.2, pMW672.5, pMW812.1, pMW1007.1, pMW1012.2, pMW1020.1, pMW1021.5, pMW1022.1, pMW1043.1





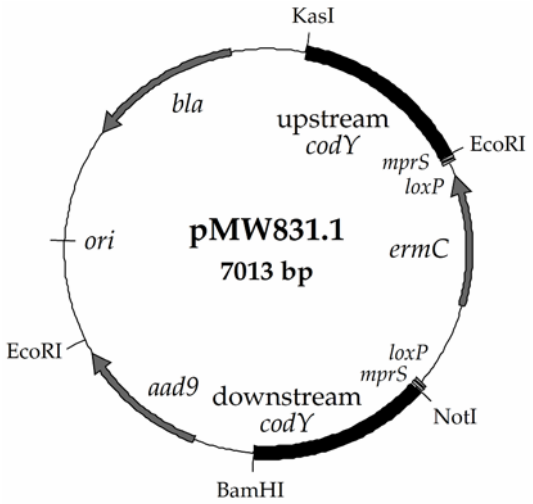


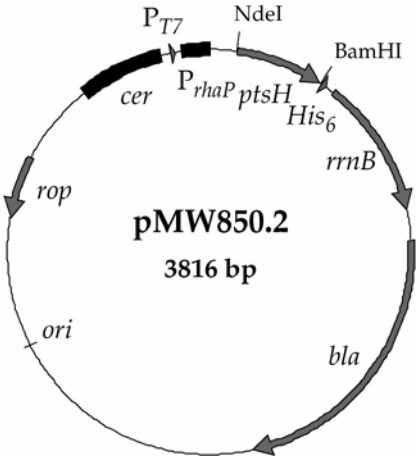
Derivate:

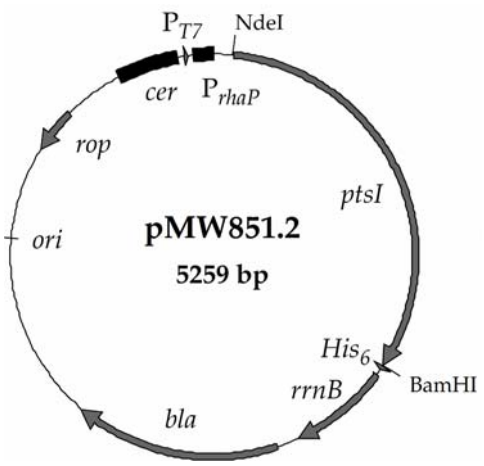
pMW718.1, pMW725.1, pMW735.3, pMW760.3, pMW804.3, pMW978.1, pMW979.1, pMW980.2, pMW981.2, pMW982.6, pMW983.1

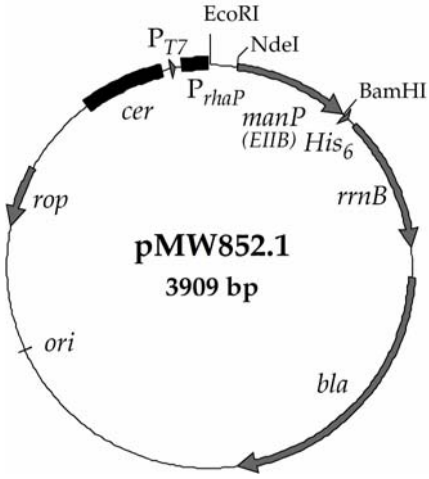
Derivate:

pMW720.1, pMW711.2, pMW722.4

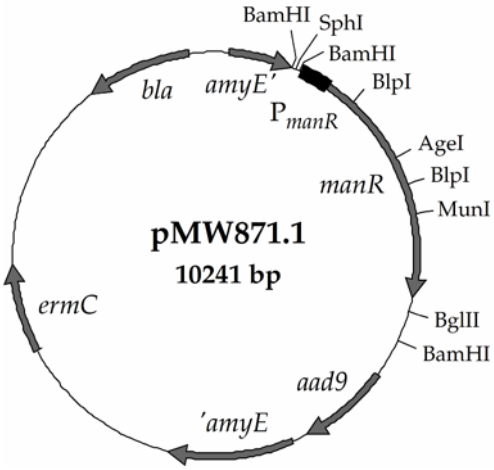


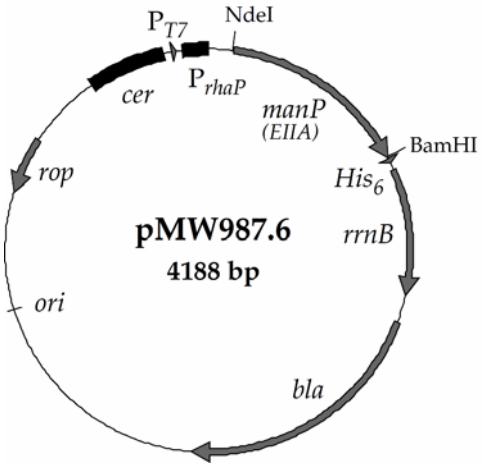






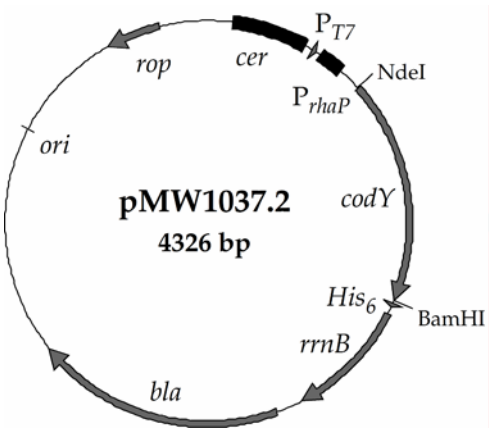
Derivat: pMW1034.7

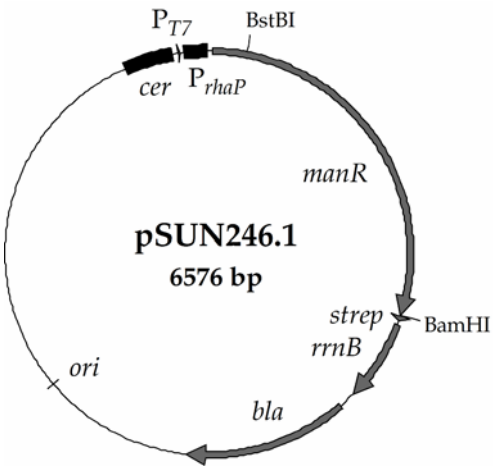




Derivate:

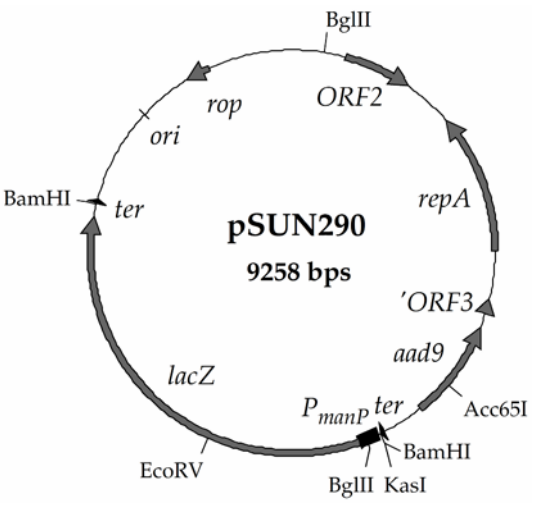
pMW889.1, pMW890.2, pMW895.11, pMW897.1, pMW898.1, pMW900.1, pMW902.1, pMW903.1, pMW906.1, pMW891.2, pMW899.1, pMW901.1, pMW904.1, pMW910.1, pMW912.1, pMW927.1, pMW933.1, pMW934.1, pMW969.2, pMW976.1





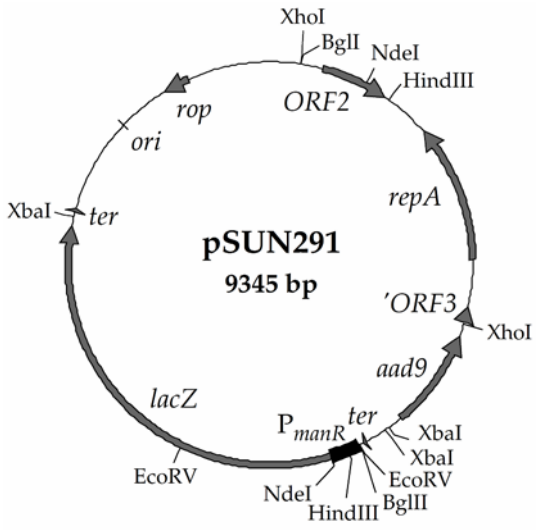
Derivate:

pMW996.2, pMW997.1, pMW998.1, pMW999.1, pMW1000.1, pMW1001.4



Derivate:

pSUN380.1, pSUN381,1, pMW712.2



Derivate:

pMW692.1, pMW720.1,
pMW711.2, pMW722.4

7 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. R. Mattes möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für das Erstgutachten dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. D. Jendrossek danke ich für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. J. Altenbuchner für die intensive Betreuung dieser Arbeit sowie für die vielen Diskussionen und Ratschläge.

Herrn Dr. M. Siemann-Herzberg danke ich für die Möglichkeit, die Fermentationen am IBVT durchführen zu können, sowie für die Diskussionen und Anregungen diesen Teil der Arbeit betreffend. Außerdem danke ich Salaheddine Laghrami, Alexander Dietrich und Andreas Freund für ihre Hilfestellungen bei den Fermentationen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen vom IIG danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, Tipps und Ratschläge sowie für die netten Gespräche rund um die Arbeit und darüber hinaus.

Der Lonza Group AG (Visp, Schweiz) und insbesondere Herrn Christoph Kiziak möchte ich für die finanzielle Unterstützung und Möglichkeit zur Patentanmeldung danken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung, und zu guter Letzt natürlich Nadja, da sie in allen Lebenssituationen immer an meiner Seite stand und mir die nötige Kraft gab.

8 Lebenslauf

Marian David Wenzel

geboren am **12.01.1983** in **Kirchheim unter Teck**

Schulbildung:

1989 – 1993	Grundschule Neidlingen
1993 – 2002	Schlossgymnasium Kirchheim u. T. Juni 2002: Abitur

Studium:

ab 10/2002	Studium der „Technischen Biologie“ an der Universität Stuttgart zum Dipl.-Biol. t.o.
01/2007 - 04/2007	Studienarbeit am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart zum Thema „Inaktivierung chromosomaler Gene durch optimierte homologe Rekombination am Beispiel von *lacZ*, *aceF*, *lpdA* und *ldhA* in *Escherichia coli*“
01/2008 - 02/2009	Diplomarbeit am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart zum Thema „Entwicklung und Optimierung von Expressionsvektoren für *Bacillus subtilis* und deren Anwendung in der Hochzelldichtefermentation“
06.02.2009	Studienabschluss als Dipl.-Biol. t.o.
03/2009 - 11/2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotion bei Prof. Dr. R. Mattes am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart