

# Transformation von *B. subtilis* 168: Optimierung und Regulation des Transkriptionsfaktors ComK

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

**Regine Franzen**

geb. Rahmer

aus Böblingen

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

Mitberichter: PD Dr. rer. nat. Martin Siemann-Herzberg

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 2017

Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart

2017



## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und nur die von mir benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regine Franzen



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abkürzungsverzeichnis .....	7
Zusammenfassung .....	9
Summary.....	11
1 Einleitung .....	13
1.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	13
1.1.1 Systematik, Morphologie und Physiologie .....	13
1.1.2 Genetische Eigenschaften .....	14
1.1.3 Minimalgenom .....	15
1.2 Bistabilität der <i>B. subtilis</i> Kultur .....	15
1.2.1 Sporenbildung und Wirkung des Phosphorelay Systems auf die Zelldifferenzierung .....	16
1.3 Kompetenz .....	19
1.3.1 Die Entdeckung der Kompetenz .....	19
1.3.2 Kompetenz bei <i>B. subtilis</i> .....	20
1.3.3 Gründe der Kompetenzentwicklung .....	22
1.4 Regulation der Kompetenz bei <i>B. subtilis</i> 168.....	23
1.4.1 Translationale Regulation der Kompetenz.....	25
1.4.2 Transkriptionelle Regulation von <i>comK</i> .....	26
1.4.3 Regulation der zellulären ComK Konzentration.....	29
1.4.4 Antwortregulator Aspartat Phosphatasen (Rap) und ihre Wirkung auf die Kompetenz .....	31
1.4.5 Einfluss multizellulären Verhaltens auf die Kompetenz .....	32
1.5 Etablierung chromosomaler – und Plasmid DNA bei der Transformation einer Zelle .....	34
1.6 Expressionssystem zur Kompetenzaktivierung .....	35
1.6.1 Das D-Mannitol-Expressionssystem.....	36
1.7 Zielsetzung .....	38
2 Material und Methoden .....	39
2.1 Bakterienstämme und Plasmide .....	39
2.1.1 Bakterienstämme.....	39
2.1.2 Plasmide .....	41
2.1.3 Gibson Assembly® Produkte .....	44
2.2 Materialien .....	45
2.2.1 Chemikalien .....	45
2.2.2 Enzyme .....	45
2.2.3 Oligonukleotide.....	46

2.2.4	Kits.....	50
2.2.5	Konfokalmikroskopie .....	51
2.2.6	Medien .....	51
2.2.7	Antibiotika und Medienzusätze .....	52
2.2.8	Puffer und Lösungen.....	53
2.3	Mikrobiologische Methoden.....	54
2.3.1	Kultivierung und Stammhaltung.....	54
2.3.2	Bestimmung der Zellmasse.....	54
2.3.3	Transformation.....	55
2.3.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	55
2.3.3.2	Transformation von <i>B. subtilis</i> nach Anagnostopoulos und Spizizen (Paris Methode).....	55
2.3.3.3	Transformation von <i>B. subtilis</i> in LB-Medium.....	56
2.3.4	Untersuchung kompetenter Zellen mit dem Mikroskop .....	57
2.3.4.1	Fixierung und Färbung.....	57
2.3.4.2	Detektion.....	57
2.4	Molekulargenetische Methoden.....	58
2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	58
2.4.1.1	Verwendete Polymerasen.....	59
2.4.1.2	Kolonie PCR.....	60
2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	60
2.4.3	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	61
2.4.4	Restriktionsverdau .....	61
2.4.5	Isopropanolfällung .....	61
2.4.6	Modifikation von DNA-Enden .....	62
2.4.6.1	Behandlung mit der alkalischen Phosphatase .....	62
2.4.6.2	Behandlung mit dem Klenow Enzym .....	62
2.4.7	Ligation .....	62
2.4.8	Plasmidisolierung.....	62
2.4.9	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i> .....	63
2.4.10	DNA-Sequenzierung.....	63
2.4.11	Markerfreie chromosomale Integration in <i>B. subtilis</i> .....	63
2.4.12	Markerfreies genetisches Engineering des <i>B. subtilis</i> Chromosoms .....	65
2.4.13	Gendeletion mit Hilfe erworbener BKE-Stämme.....	66
2.4.14	Deletion mittels Gibson Assembly <sup>®</sup> von NEB .....	67
3	Ergebnisse .....	69
3.1	Entwicklung einer Methode zur Transformation von <i>B. subtilis</i> in Vollmedium .....	69
3.1.1	Transformation von <i>B. subtilis</i> in LB-Medium mit Hilfe eines Mannitol induzierbaren <i>comK</i> Gens .....	69
3.1.2	Austesten verschiedener, mit Mannitol induzierbarer Kompetenzfaktoren auf die Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	72

3.1.3	Versuche zur Optimierung des Transformationsprotokolls für REG19 ..75	
3.1.3.1	Einfluss der Induktionszeit mit Mannitol auf die Transformationsrate ...75	
3.1.3.2	Abhängigkeit der Transformationsrate von der Menge an zugegebener DNA.....76	
3.1.3.3	Einfluss des Wachstumsmedium auf die Transformation .....78	
3.1.4	Auswirkung der Mannitol Zugabe auf das Wachstumsverhalten von REG19 während der Transformationsversuche .....79	
3.1.5	Transformationsprotokoll für den Stamm REG19.....82	
3.1.6	Herstellung und Lagerung kompetenter Zellen .....83	
3.2	Transformationeffizienz bei der MG- und der LB-Methode.....85	
3.2.1	Bestimmung der Transformationsrate im Vergleich zur Zellzahl .....85	
3.2.2	Bestimmung der Anzahl kompetenter Zellen durch Mikroskopie.....86	
3.2.3	Zahl der Zellen mit DNA-Aufnahmekomplexen.....90	
3.3	Einfluss von Kompetenzfaktoren auf die Transformation von REG19...93	
3.3.1	Einfluss des natürlichen <i>comK</i> Gens auf die Transformation von REG19.....93	
3.3.2	Auswirkungen der Deletion von Genen in REG19, die die <i>comK</i> Transkription regulieren.....97	
3.3.3	Posttranskriptionelle Regulation von ComK: Auswirkungen der Deletion von <i>mecA</i> auf die Transformationseffizienz von REG19 .....99	
3.3.4	Auswirkungen der Deletionen von Genen, die in dem Phosphorelay System zur Differenzierung von <i>B. subtilis</i> involviert sind, auf die Transformationsrate von REG19 .....102	
3.3.5	Auswirkung der Deletionen von Genen für Antwortregulator Aspartat Phosphatasen auf die Transformationsrate von REG19 .....103	
3.3.6	Auswirkung der Deletion von <i>degU</i> , <i>sinR</i> , <i>sinI</i> und <i>slrR</i> auf die Transformationsrate von REG19 .....106	
3.3.7	Auswirkung der Deletionen von <i>maf</i> , <i>yneA</i> und <i>comZ</i> auf die Transformationsrate von REG19 .....108	
3.3.8	Deletion des Kompetenz Repressorgens <i>kre</i> und der Sigma B und Sigma D kodierenden Gene <i>sigB</i> und <i>sigD</i> und ihre Wirkung auf die Transformationsrate von REG19 .....111	
3.3.9	Auswirkung der Deletion von <i>dprA</i> , <i>addA</i> , <i>recJ</i> und <i>recA</i> auf die Transformationsrate von REG19 .....113	
3.4	Untersuchungen zur Plasmidetablierung in REG19 .....117	
3.5	Test eines weiteren Promotors zur Expression von <i>comK</i> und <i>comS</i> ....121	
3.6	Deletion von chromosomalen Genen mit der Gibson Assembly® Methode .....126	
3.7	Einfluss der Länge von DNA-Fragmenten auf die homologe Rekombination (HR).....129	
3.8	Kotransformationsversuche mit REG19 .....131	
4	Diskussion.....134	

---

4.1	Transformation bei <i>Bacillus subtilis</i> 168: Entwicklung einer optimierten Transformationsmethode .....	134
4.2	Beeinflussung der Transformation.....	137
4.3	Auswirkung der DNA auf die Transformation .....	146
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	150
5	Literaturverzeichnis.....	152
6	Anhang .....	165
6.1	Plasmidkarten.....	165
6.2	Sequenz des <i>trpC</i> Gens von <i>B. subtilis</i> 168 .....	166
6.3	Sequenz des <i>trpC</i> Gens von <i>B. subtilis</i> KM0.....	166
7	Danksagung.....	167
8	Lebenslauf .....	169



## Abkürzungsverzeichnis

Amp ( <i>bla</i> )	Ampicillin (Resistenzgen)
BGSC	Bacillus Genetic Stock Center
bp	Basenpaare (e)
Clb	Cellibiose
Cm ( <i>cat</i> )	Chloramphenicol (Resistenzgen)
<i>cre</i> (-Sequenz)	<i>catabolite responsive element</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Δ (Delta)	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP(s)	desoxy-Nukleotidtriphosphat(e)
dYT (-Medium)	<i>double yeast extract + tryptone</i> (-Medium)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP ( <i>eGFP</i> )	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> (Gen)
Erm ( <i>erm</i> )	Erythromycin (Resistenzgen)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
FM4-64	N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino)Phenyl)Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide
GA	Gibson Assembly®
GC-Gehalt	Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der Basen in Prozent
FP	<i>forward</i> -Primer
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb	Kilobasen (1.000 Basenpaare)
Km ( <i>neo</i> )	Kanamycin (Resistenzgen)
LB (-Medium)	<i>Lysogeny Broth</i> (Medium)
LSM	laser scanning microscope

Man	Mannose
MG (-Medium)	<i>Spizizen's Minimal Salt Medium</i>
Mtl	Mannitol
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
~P	Phosphorylgruppe (energiereich)
P <sub>x</sub>	Promotor von Gen <i>x</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RP	<i>reverse-Primer</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur (ca. 20 °C)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEL	Spurenelementlösung
Spc ( <i>aad9</i> )	Spectinomycin (Resistenzgen)
TAE	TRIS / Acetat / EDTA
TE	TRIS / EDTA
<i>ter</i>	Transkriptionsterminator
TK	Tagkultur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
TY	Trypton / <i>Yeast</i> (=Hefeextrakt)
U	Unit Restriktionsenzym
ÜK	Übernachtkultur
VE	vollständig entionisiert
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

*B. subtilis* 168 entfaltet während des Wachstums in Minimalmedium mit Glucose eine natürliche Fähigkeit zur Aufnahme von DNA (Kompetenz). Dies betrifft in einer Kultur jedoch nur wenige Prozent der Zellen, da sich die Population in verschiedene Subpopulationen differenziert. Die übrigen Zellen zeichnen sich durch unterschiedliche Eigenschaften wie die Sporen-, Biofilmbildung oder die Sekretion von Enzymen aus. Daher wurde der Stamm REG19 konstruiert. Dieser zeichnet sich darin aus, dass mehr Zellen kompetent werden und zur Folge eine gesteigerte Transformationsrate vorliegt. REG19 unterscheidet sich vom *B. subtilis* 168 Wildtyp darin, dass er die für die Kompetenzentwicklung essentiellen Gene *comK* und *comS* doppelt enthält. Die zusätzlichen Gene wurden in das Chromosom zusammen mit einem durch Mannitol induzierbaren Promotor  $P_{mtlA}$  in einer Kompetenzkassette ( $P_{mtlA} comK-comS$ ) eingefügt. Gleichzeitig wurde ein neues Transformationsprotokoll entwickelt und optimiert. Die Vorteile dieses neuen Systems bestehen darin, dass die Transformation in Vollmedium durchgeführt werden kann. Dadurch konnte der Ablauf der Kompetenzbildung wesentlich verkürzt und eine deutlich verbesserte Steigerung und Reproduzierbarkeit der Transformationsrate erreicht werden. Insbesondere ist aber damit eine Transformation von Stämmen möglich, die Mutationen in Genen wie *abrB*, *degU* oder *spo0A* tragen und nach der Methode von J. Spizizen und C. Anagnostopoulos (1961) nicht mehr transformierbar sind. Darauf basierend wurden weitere 26 Gene in REG19 deletiert, die direkt oder indirekt die Kompetenzentwicklung beeinflussen. Die Mutanten wurden auf eine veränderte Transformationsrate untersucht.

Die Analyse der Transformationsraten dieser Stämme zeigte, dass der für alle Differenzierungsvorgänge essentielle Transkriptionsregulator Spo0A~P für die Kompetenzentstehung entbehrlich ist, wenn die zusätzliche Kompetenzkassette in dem Stamm REG19 aktiviert ist. Des Weiteren ist die Kompetenzbildung in REG19 unabhängig von dem Quorum sensing Mechanismus, der üblicherweise die Kompetenz aktiviert. Die Deletion der Gene *comQ* und *comX* zusammen mit den Genen des Zwei-Komponentensystems ComP und ComA resultierte sogar in einer gesteigerten Transformationsrate im Vergleich zu REG19. Eine weitere Steigerung der Transformationsrate wurde erreicht, indem das Gen *degU* deletiert wurde. Der Regulator DegU initiiert im dephosphorylierten Zustand die Kompetenz, während er im phosphorylierten Zustand die Synthese von

extrazellulären Proteinen aktiviert. Die Deletion des nativen *comK* Gens inklusive des Promotors zeigte, dass das native *comK* Gen trotz der Kompetenzkassette weiterhin essentiell für die Transformationsfähigkeit ist. Somit kann man davon ausgehen, dass in REG19 die Kompetenz über einen Zweischnitt-Mechanismus verläuft. Zunächst wird die ComK Menge über die Mannitol induzierte Expression der Kompetenzkassette unabhängig vom Zellzustand gesteigert. Ab einer bestimmten Menge hat dies zur Folge, dass ComK an seinen eigenen Promotor binden kann. Durch eine positive Feedback Regulation wird die Menge an ComK gebildet, die schließlich zur Induktion der Kompetenz führt. Dieser Zweischnitt-Mechanismus und Bedarf an nativem *comK* Gen konnte überwunden werden, wenn in der Kompetenzkassette der mannitolinduzierbare Promotor durch einen cellibioseinduzierbaren Promotor ( $P_{licB}$ ) ersetzt wurde (REG89). Die Transformationsrate von *B. subtilis* mit Plasmid-DNA ist im Vergleich zu chromosomaler DNA ungewöhnlich niedrig. Zudem ist die Transformation mit Plasmid-DNA erfolgreicher, wenn die Plasmide eine multimeren Konformation besitzen. Es gibt zwei Hypothesen zur Etablierung der transformierten Plasmid-DNA in *B. subtilis*. Nach der ersten Hypothese werden zwei komplementäre Stränge eines Plasmids unabhängig voneinander in die Zelle aufgenommen, zum Doppelstrang hybridisiert und anschließend zum zirkulären Plasmid ligiert. Die zweite Hypothese geht davon aus, dass der aufgenommene Einzelstrang durch Replikation zum Doppelstrang ergänzt wird und an den überstehenden Einzelstrangenden zirkularisiert wird. In dieser Arbeit konnte zunächst festgestellt werden, dass REG19 auch monomere Plasmide aufnehmen kann, wenn auch mit einer geringeren Effizienz. Durch eine gleichzeitige Transformation von REG19 mit zwei Plasmiden, die sich durch eine Mutation in dem Spectinomycinresistenzgen unterschieden, konnten zwei Aussagen getroffen werden. Einerseits zeigte der Prozentsatz an spectinomycinresistenten Kolonien, dass die zweite Hypothese richtig ist, zudem wurde nachgewiesen, dass RecA essentiell für die Rekombination der beiden etablierten Plasmide ist.

Die gesteigerte Transformationsrate ermöglicht nun eine vereinfachte und zeitsparende Genomveränderung. Dabei kann auf die Verwendung von Plasmiden verzichtet werden, indem Fragmente mit Hilfe der Gibson Assembly Methode konstruiert und erfolgreich transformiert werden. Die Stämme REG19 und REG89 ermöglichen eine effiziente und schnelle Stammoptimierung, wodurch sie sich in der Wissenschaft als Klonierungstämmen und zur industriellen Nutzung als Produktionsstämmen eignen.

## Summary

*B. subtilis* 168 is able to take up and internalize extracellular DNA (competence). If using minimal medium containing glucose, cells become competent in the post exponentially growth phase. Only a minority of the cells in a competent culture become competent, because the population differentiates into various subpopulations. The remaining cells are distinguished by different characteristics. Some of them sporulate, other form biofilm or secrete enzymes. Therefore, the strain REG19 was constructed. REG19 is characterized by a higher number of competent cells and by increased transformation efficiency. REG19 differs from the wild type strain 168 by containing essential competence development genes (*comK* and *comS*) twice. The additional genes are inserted into the chromosome under the control of the mannitol-inducible promoter  $P_{mIA}$  in a competence cassette ( $P_{mIA} comK comS$ ). Simultaneously, a new transformation protocol was developed and optimized. The advantages of the protocol are that the cells can be transformed in rich media in a shorter time and the transformation efficiency is significantly and reproducibly increased. In particular, strains with mutations in genes as *abrB*, *degU* or *spo0A* are transformable whereas these strains are no longer transformable with the method of J. Spizizen and C. Anagnostopoulos (1961). Based on that, 26 additional genes were deleted in REG19 which affect directly or indirectly the competence development in *B. subtilis* 168. The mutants were screened for altered transformation efficiency.

Analysis of the transformation efficiency of these strains showed that the transcription regulator Spo0A~P is dispensable, when the additional competence cassette is activated in REG19. Normally Spo0A~P is essential for all cell differentiation processes. Furthermore, competence development in REG19 is independent of the quorum sensing mechanism of the operon ComQXPA, which typically activates competence. The deletion of the *comQ* and *comX* genes together with the genes of the two-component system ComP and ComA even resulted in an increased transformation efficiency compared to REG19. A further increase of the transformation efficiency was achieved, when *degU* was deleted. The regulator DegU initiates competence in a dephosphorylated state, while phosphorylated DegU activates the synthesis of extracellular proteins. The deletion of the native *comK* gene including the promoter in REG19 showed that the native *comK* gene remains essential for transformation ability despite of the activated compe-

tence cassette. Thus, it can be assumed that competence passes via a two-step mechanism in REG19. First, independent of the cell state, the ComK pool is increased by the mannitol induced expression of competence cassette. From a certain amount of ComK ComK is able to bind its own promoter. A positive feedback regulation composes the amount of ComK which results in competence activation. This two-step mechanism and the need for the native *comK* gene might be overcome, when the mannitol inducible promoter  $P_{mtlA}$  is replaced by a cellibiose inducible promoter ( $P_{licB}$ ) (REG89).

The transformation efficiency of *B. subtilis* with plasmid DNA is unusually low compared to chromosomal DNA. Plasmids should also have a multimeric conformation and the transformation should be RecA independent. According to a hypothesis, first of all the two complementary plasmid strands should be taken up independently. After that, the strands are hybridized to a double stranded DNA in the cell and ligated in the end to a circular plasmid. A second hypothesis assumes that the absorbed single strand is complemented to a double stranded DNA by replication and circulation of overlapping single stranded ends. It was discovered that in REG19 monomeric plasmids can be transformed, albeit with a lower efficiency. By a simultaneous transformation of two plasmids, which differ in various point mutations in the spectinomycin resistance gen. Spectinomycin resistant transformants could be obtained in the *recA* containing strain, but not in the *recA* deficient strain. These results and the percentage of spectinomycin resistant colonies in a *recA* positive strain suggest that the second hypothesis is correct. In addition the increased transformation efficiency enables a simplified and time-saving genome modification. Thereby the use of plasmids can be dispensed with fragments, which are constructed by the Gibson Assembly method and successfully transformed. Thus, the strains REG19 and REG89 allow fast and efficient strain engineering in scientific and industrial use.

# 1 Einleitung

## 1.1 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* ist ein ubiquitär vorkommendes, stäbchenförmiges, Gram-positives, begeißeltes Bakterium, das in den letzten Jahrzehnten zu einem Modellorganismus für die genetische, molekularbiologische und biotechnologische Forschung weiter entwickelt wurde. Dies liegt unter anderem an der Fähigkeit, trotz genetischer Uniformität, sich in eine Vielzahl von Zelltypen zu differenzieren. Heute gehört *B. subtilis* zu den am bestuntersuchtesten Gram-positiven Bakterien. Neben dem vollständig sequenzierten Genom stehen inzwischen auch zahlreiche ausführliche Transkriptom-, Proteom- und Metabiomdaten zur Verfügung. Die Entdeckung der Kompetenz ermöglichte den Anfang der Genkartierung und ist heute im Laboralltag und in der Entwicklung eines optimalen Produktionsstammes essentiell.

### 1.1.1 Systematik, Morphologie und Physiologie

C. G. Ehrenberg beschrieb im Jahre 1835 erstmals *Bacillus subtilis* (lat. *bacillus* – Stäbchen; *subtilis* – einfach, schlicht), damals noch unter dem Namen *Vibrio subtilis* (lat. *vibrare* – sich schnell hin- und her bewegend, vibrieren) (Ehrenberg, 1835). Im Jahre 1872 wurde es von F. J. Cohn in *Bacillus subtilis* umbenannt (Cohn, 1872). Taxonomisch gehört es zum Reich der Bacteria, genauer zu den Gram-positiven Firmicutes. Dort wird es aufgrund seines niedrigen GC-Gehaltes zu der Klasse der Bacilli gezählt, welche derzeit 299 bekannte Arten enthält (LPSN-Datenbank<sup>1</sup>). Dazu gehören auch die humanpathogenen Vertreter wie der Milzbranderreger *B. anthracis*, das Lebensmittelvergiftung verursachende *B. cereus* und das Insekten-pathogene *B. thuringiensis*. Letzteres wird in der Land- und Forstwirtschaft zur biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt.

*B. subtilis* ist selten pathogen und bildet im vegetativen Zustand ein 2 - 3 µm langes und ca. 0,6 µm breites Stäbchen. Es ist mehrfach, über die gesamte Oberfläche verteilt (peritrich), begeißelt und dadurch schnell beweglich. Es ist ubiquitär verbreitet und kann aus Boden, Wasser oder Luft isoliert werden. Sein natürlicher Lebensraum ist jedoch die

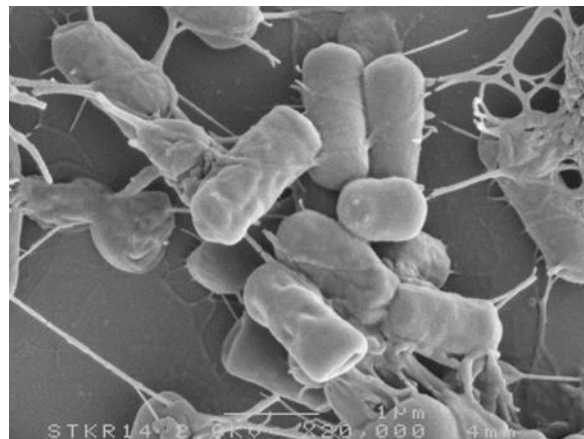
---

<sup>1</sup> <http://www.bacterio.net/bacillus.html>

oberste Bodenschicht (Rhizosphäre), die es durch seine chemoorgano-heterotrophe Lebensweise besiedelt. Dabei nutzt es Nährstoffe von Pflanzen und anderen Lebewesen, um seine eigene Energie und Biomasse zu generieren (Fuchs *et al.*, 2007). Des Weiteren ist es ein typisches Fäulnisbakterium, das durch seine Vielzahl an extrazellulären Enzymen, wie Proteasen und Glucanasen, an der Rückführung organischer Stoffe in den Nahrungskreislauf beteiligt ist. Es ist mesophil, fakultativ aerob und bevorzugt Glucose als Kohlenstoffquelle. Durch die Katabolitrepression wird die Expression anderer Zuckerverwertungsgene zu Gunsten von Glucose unterdrückt. Bei Sauerstofflimitationen und in 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). Gerade durch seinen Lebensraum in der Erde ist es oft widrigen Umweltbedingungen ausgesetzt. Nährstoff- oder Sauerstofflimitationen kann es durch eine generelle Stressantwort überleben, wobei es durch das Spo0A-Phosphorelay-System thermoresistente Endosporen bildet (Hoch, 1993).

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

<b>Reich</b>	Bacteria
<b>Abteilung</b>	Firmicutes
<b>Klasse</b>	Bacilli
<b>Ordnung</b>	Bacillales
<b>Familie</b>	Bacillaceae
<b>Gattung</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Art</b>	<i>Bacillus subtilis</i>



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

### 1.1.2 Genetische Eigenschaften

Im Jahr 1997 wurde die vollständige Sequenz des *B. subtilis* 168 Genoms veröffentlicht. *B. subtilis* 168 ist ein Abkömmling des Stammes *B. subtilis* Marburg. Dieser wurde im Jahre 1947 isoliert und ist selbst nicht mehr vorhanden (Burkholder & Giles, Jr., 1947). Der zirkuläre DNA-Doppelstrang umfasst insgesamt 4215606 bp (GenBank: AL009126) und einen GC-Gehalt von 43,5 %. Das Genom enthält 4244 Gene, welche für verschiedenste Proteine, 86 tRNAs, 30 rRNAs und 62 weitere RNAs codieren. Diese



codierende Sequenz entspricht 87 % der Gesamtsequenz (Moszer *et al.*, 2002). Für die industrielle Nutzung war diese Analyse wichtig, da sie eine weitere Optimierung von effizienten Produktionsstämmen ermöglichte. Für die prokaryoten Genetik ist *B. subtilis* von besonderer Bedeutung, da es die Eigenschaft der Kompetenzausbildung hat. Unter bestimmten physiologischen Bedingungen ist es in der Lage, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Diese Fähigkeit war entscheidend für den Beginn der genetischen Untersuchung.

### 1.1.3 Minimalgenom

Um *B. subtilis* 168 besser verstehen zu können, versuchen verschiedene Arbeitsgruppen das Genom des Stammes soweit zu reduzieren, dass es nur noch essentielle Gene enthält. Dieses Feld ist eine aufstrebende Disziplin der Synthetischen Biologie mit dem Ziel, konzipierte Zellen und Organismen künstlich zu generieren (Gibson *et al.*, 2010). Eine der ersten umfassenden Studien, welche die Zahl der essentiellen Gene in einem Organismus beschreibt, wurde für Bakterien mit *B. subtilis* durchgeführt. Durch die Inaktivierung jedes einzelnen Gens konnte gezeigt werden, dass *B. subtilis* gerade einmal 271 essentielle Gene besitzt. Dies ist bis jetzt die kleinste bekannte Menge für einen funktionierenden Organismus (Kobayashi *et al.*, 2003). Da *B. subtilis* jedoch viele Gene mit mehreren Funktionen besitzt, entspricht diese Zahl einer höheren Anzahl an Genen (ca. 600 bis 700) bei anderen Organismen. In der Zukunft müssen die Funktionen aller (essentiellen und nicht essentiellen) Gene aufgeklärt werden, um die gesamte Biologie der *B. subtilis* Zellen zu verstehen. Denn nur dann können Zellen mit einem Minimalgenom generiert werden, die für die biotechnologische Nutzung optimal maßgeschneidert sind (Commichau *et al.*, 2013).

## 1.2 Bistabilität der *B. subtilis* Kultur

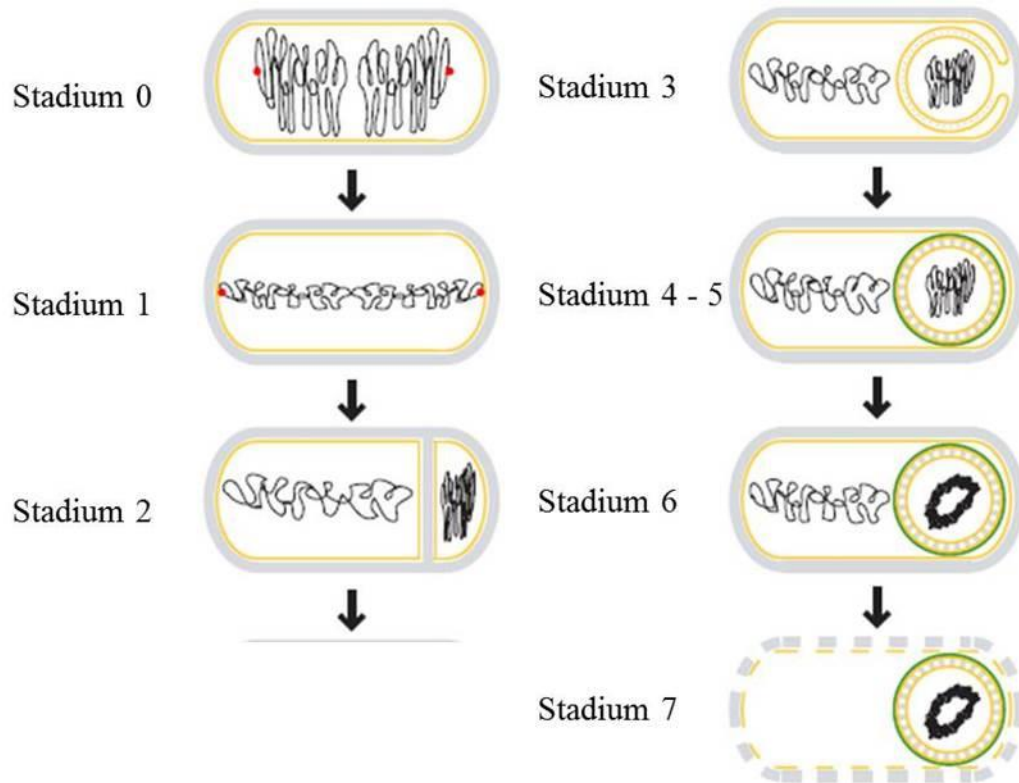
In *B. subtilis* kommt es am Übergang von der vegetativen Wachstumsphase zur stationären Phase aufgrund von Nahrungsmangel, einer hohen Zelldichte und anderen Stressfaktoren zu einer phänotypischen Variabilität innerhalb der Zellpopulation. Die Grundlage für eine derartige Variabilität bilden ineinander verkettete Signalwege, die externe Einflüsse wahrnehmen und weiterleiten können. Durch die Expression des „Transition Phase“ Regulator Proteins AbrB verbleiben die Zellen solange wie möglich in der ex-

ponentiellen Wachstumsphase. Ausgelöst durch einen Nahrungsmangel und der anschließenden Inaktivierung der *abrB* Expression, kann die Population von der exponentiellen Phase in die stationäre Phase übergehen (Perego *et al.*, 1988; Banse *et al.*, 2008) und ist dabei in der Lage, sich in unterschiedliche Subpopulationen zu differenzieren. Diese Subpopulationen unterscheiden sich und zeichnen sich durch unterschiedlichste Eigenschaften wie Sporenbildung, Biofilmbildung, verstärkte Motilität, Sekretion von Enzymen und Antibiotika sowie durch Kompetenzbildung aus (Lopez *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2008). Nach der Zelldifferenzierung zeigen die Zellen nur eine dieser Eigenschaften auf und sind nicht mehr in der Lage diese zu wechseln. Der Hauptfaktor für diesen Differenzierungsprozess ist Spo0A~P, der ebenfalls der Masterregulator bei der Sporulation ist.

### 1.2.1 Sporenbildung und Wirkung des Phosphorelay Systems auf die Zelldifferenzierung

Die Sporulation führt dazu, dass sogenannte Endosporen gebildet werden können. Diese zeichnen sich durch Hitzestabilität, hohe Resistenz gegen schädliche Agentien und eine metabolische Inaktivität aus. Die Endospore als Zelltypus ist einer der belastbarsten Zelltypen in der Natur. Sie ist in der Lage, raue Umweltbedingungen über mehrere Jahrzehnte zu überdauern (Paredes-Sabja *et al.*, 2011). Wenn Sporen bessere Wachstumsbedingungen wahrnehmen, keimen diese aus und nehmen ihren vegetativen Zellzyklus wieder auf (Cano & Borucki, 1995; Vreeland *et al.*, 2000; Setlow, 2007). Die Initiierung der Sporulation ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt und wird durch ein Phosphorelay System reguliert (Abbildung 3). Die Sporulation beginnt in *B. subtilis*, sobald sich die Zelle asymmetrisch teilt und sich an einem Pol ein Septum mit einem weiteren identischen Chromosom bildet (Stadium 2 in Abbildung 2). In der Zelle entstehen dadurch zwei Kompartimente, eine größere „Mutterzelle“ und eine kleinere Vorläuferspore. Beide Kompartimente sind kurzzeitig von einer gemeinsamen äußeren Zellwand umgeben, bis sich das bisher flache Septum krümmt. Wenn anschließend die Mutterzelle die Vorläuferspore einverleibt, entsteht eine membranumgebene, kugelförmige Organelle im Cytosol der Mutterzelle (Stadium 3). Die Vorläuferzelle reift zu einer ruhenden Zelle heran und wird als Spore in die Umgebung abgegeben, sobald die Mutterzelle die programmierte Zellyse einleitet (Stadium 7) (Tan & Ramamurthi, 2014). Das Phosphorelay System ist eine komplexe Version eines Zwei-Komponenten

Signalweges, wobei verschiedene Antwortregulatoren an der Übertragung einer Phosphatgruppe beteiligt sind. Die Erweiterung der Komponenten ermöglicht dem Bakterium, auf verschiedene Stimuli zu reagieren.

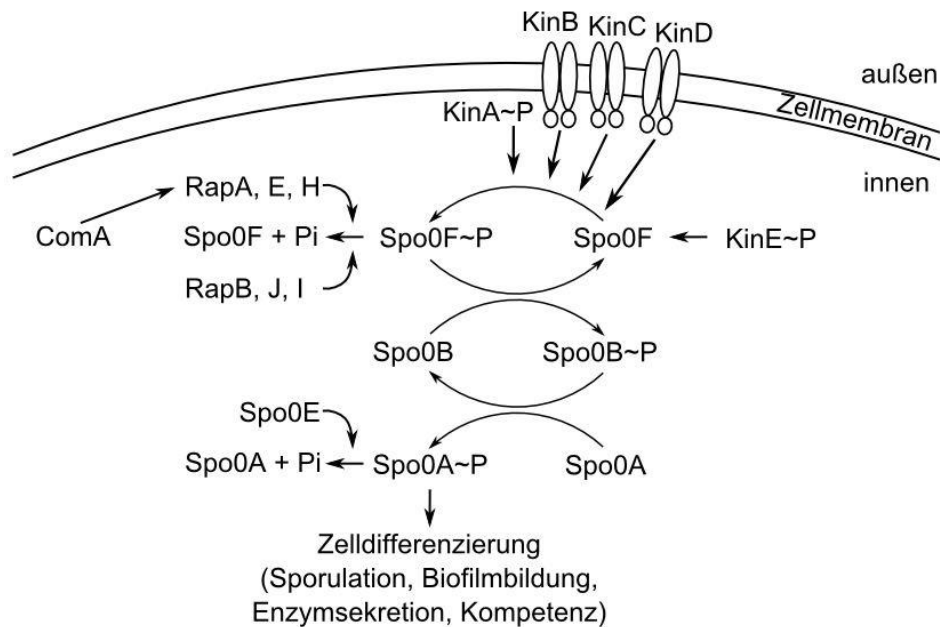


**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Morphologie während der Sporulation in *B. subtilis*.**

Die Endosporenbildung kann in 8 Stadien (Stadium 0-7) unterteilt werden, diese sind hier nach dem Schema von Ryter (1965) dargestellt. Dabei ist das Peptidoglykan in grau, die Membranen in gelb, die DNA in schwarz und die Sporenhülle in grün dargestellt. Die roten Punkte in Stadium 0 und Stadium 1 stellen den Start der Replikation der chromosomalen DNA dar. Im Stadium 0 erfolgt eine Replikation des Chromosoms, ohne dass eine offensichtliche morphologische Veränderung zu erkennen ist. Anschließend kondensiert die chromosomale DNA, wobei sich die DNA am Replikationsstart an den Zellpolen anlagert (Stadium 1). Im Stadium 2 ist ein polares Septum entstanden, wodurch zwei Protoplasten in der Zelle mit je einem Chromosom entstehen. Im dritten Stadium umwächst die Cytoplasmamembran der Mutterzelle das kleinere Kompartiment (Vorspore). Dadurch kann sich in den Stadien 4 und 5 die Sporenhülle (Cortex) und die Keimzellwand bilden. Das Stadium 6 stellt die Sporenenreife dar, die durch die Kondensierung und Ringbildung des Vorsporeenchromosoms charakterisiert ist. Zum Schluss wird die reife Spore durch die Autolyse der Mutterzelle freigesetzt (Stadium 7) (verändert nach Tan & Ramamurthi, 2014).

Die Zelle initiiert die Sporulation zu einem definierten Zeitpunkt, welcher von der Spo0A~P Konzentration in der Zelle abhängt. Um Spo0A zu phosphorylieren, wird ein Phosphatrest von Spo0F über Spo0B auf Spo0A übertragen (Burbulys *et al.*, 1991; Perego & Brannigan, 2001). Dieser Phosphatrest stammt von zwei cytoplasmatischen

Kinasen (KinA und KinE), sowie drei membrangebundenen Kinasen (KinB, KinC und KinD) (Jian *et al.*, 2000). Durch die grundlegende metabolische, physiologische und morphologische Veränderung der Zelle bei der Sporulation ist es wichtig, dass die Sporenbildung genauestens reguliert wird. Das Phosphorelay-System bietet dabei viele Ansatzpunkte und wird hauptsächlich von zwei Aspartyl-Phosphat-Phosphatase Familien (Rap und Spo0E) reguliert (Perego *et al.*, 1994; Ohlsen *et al.*, 1994). RapA, -E, -H und RapB, -J, -I dephosphorylieren Spo0F, so dass kein Phosphat mehr auf Spo0B übertragen werden kann (Zapf *et al.*, 1998). Spo0E dephosphoryliert Spo0A, wodurch die Konzentration an Spo0A~P in der Zelle abnimmt.



**Abbildung 3: Das Phosphorelay Signal Transduktionssystem zur Zelldifferenzierung.** Bei dem Phosphorelay-System phosphorylieren zwei cytoplasmatische Kinasen (KinA und KinE) sowie drei membrangebundene Kinasen (KinB, KinC und KinD) das Protein Spo0F (Jian *et al.*, 2000). Von Spo0F~P wird anschließend die Phosphatgruppe über die Phosphotransferase Spo0B auf den Antwortregulator und Differenzierungsinitiator Spo0A transferiert. Rap Phosphatasen dephosphorylieren Spo0F~P bzw. hemmen die Phosphorylierung von Spo0F. Sie wirken damit auf die Zelldifferenzierung, ebenso wie Spo0E, das Spo0A~P dephosphoryliert. Die Konzentration von Spo0A~P, die in der Zelle vorliegt, reguliert die Zelldifferenzierung. Eine hohe Spo0A~P Konzentration führt zur Endosporenbildung, wohingegen eine geringe Spo0A~P Konzentration die Biofilmbildung und Enzymsekretion reguliert sowie die Kompetenz aktiviert. Die Pfeile beschreiben hierbei die Übertragungsrichtung des Phosphatrestes (verändert nach Perego & Brannigan, 2001).

Die Kompetenz und die Sporulation sind konkurrierende Differenzierungsprozesse. Dies zeigt sich einerseits an der Funktion von Spo0A~P, als auch daran, dass die Expression von RapA durch ComP/ComA (Zweikomponentensystem zur Aktivierung der Kompetenz) aktiviert wird. Eine hohe Spo0A~P Konzentration führt dazu, dass die Zelle eine Endospore ausbildet und somit die Kompetenz hemmt. Eine geringe Spo0A~P Konzentration reguliert die Biofilmbildung und Enzymsekretion sowie aktiviert die Kompetenz.

### 1.3 Kompetenz

Unter Kompetenz versteht man eine natürliche Form der DNA Aufnahme, welche in *Streptococcus pneumoniae* entdeckt und mittlerweile bei verschiedenen Bakterien (*Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* oder *Neisseria gonorrhoeae*) beobachtet werden kann. Der Zustand, in dem die Bakterien frei vorhandene DNA aufnehmen können, wird als natürliche Kompetenz bezeichnet. Hierbei benötigen die Bakterien spezifische Gene, deren Genprodukte für die Erkennung von freier DNA, der DNA-Aufnahme, der Stabilisierung von einzelsträngiger DNA in der Zelle und der Genomintegration dieser DNA bzw. der Plasmidbildung verantwortlich sind.

#### 1.3.1 Die Entdeckung der Kompetenz

Die natürliche Kompetenz wurde zum ersten Mal von Frederick Griffith an „Pneumokokken“ (*Streptococcus pneumoniae*) im Jahre 1928 beschrieben. *S. pneumoniae* kommt einerseits in einer krankheitserregenden schleimkapselbildenden S-Form (*smooth* für glatt) sowie in einer nicht kapselbildenden, nicht pathogenen R-Form (*rough* für rau) vor. Zudem stellte Griffith fest, dass die Injektion von mittels Hitze abgetöteter S-Pneumokokken nicht letal für Mäuse ist. Wurde jedoch eine Kombination aus durch Hitze abgetöteten S-Pneumokokken zusammen mit lebenden R-Pneumokokken in die Mäuse injiziert, wirkte dies letal. Dies ließ ihn vermuten, dass über eine Transformation die Fähigkeit zur Bildung der Schleimkapsel aus toten S-Zellen in lebende R-Zellen übertragen wird (Griffith, 1928).

Im Jahre 1944 zeigten Oswald Avery und seine Mitarbeiter, dass DNA der S-Pneumokokken in die R-Pneumokokken übertragen wurde. Dafür wiederholten sie das Experiment und gaben zu den abgetöteten S-Pneumokokken entweder Proteasen,

RNasen oder DNasen hinzu. Im Falle der Zugabe von DNase entstanden keine pathogenen Pneumokokken, womit bewiesen werden konnte, dass die DNA als Überträgermaterial der Information dient. Diese Erkenntnis war eine der wichtigsten Schritte zum Verständnis, dass die DNA der allgemeine Träger der Erbinformation ist (Avery *et al.*, 1944).

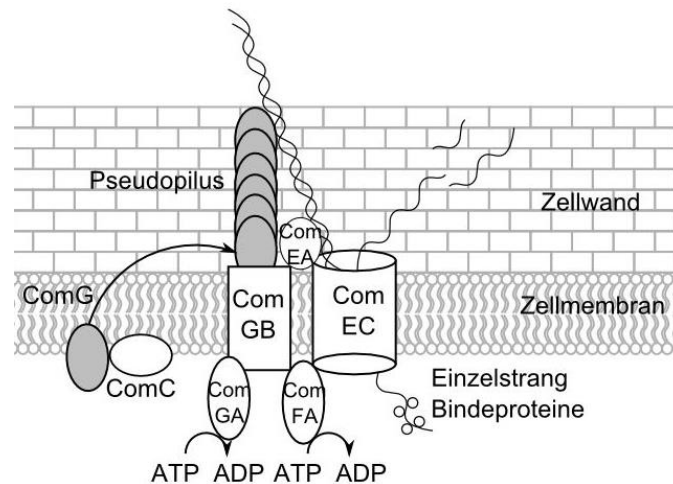
### 1.3.2 Kompetenz bei *B. subtilis*

John Spizizen beobachtete 1958, dass der Stamm *B. subtilis* 168 unter speziellen Wachstumsbedingungen in seiner Zellwandsynthese beeinflusst ist, wodurch die Zellen „kompetent“ gegenüber der Transformation wurden. Für den Transformationsversuch verwendete er den Stamm *B. subtilis* 168, der eine Mutation in der Indol-3-Glycerin-Phosphat Synthetase (*trpC2*) hat und damit Tryptophan auxotroph ist. Als Donor-DNA verwendete er die gesamte DNA des Stammes *B. subtilis* 23, welcher sich durch einen *trpC*<sup>+</sup> Genotyp auszeichnet und dadurch Tryptophan prototroph ist. Diese Transformation führte dazu, dass der neue Stamm ebenfalls *trpC*<sup>+</sup> wurde (Spizizen, 1958).

Im Jahre 1961 entwickelte J. Spizizen zusammen mit C. Anagnostopoulos ein Protokoll für die Ausbildung der Kompetenz, das auf einem 2-stufigen Wachstum und einem speziellen Medium basiert. Bei dem Medium handelt es sich um ein Glucose-Minimalmedium, dem spezielle Salze (Spizizen-Salze) und eine geringe Menge eines Aminosäuregemisches mit kleinen Peptiden aus der Kaseinhydrolyse (auch bekannt als Casamino acids) zugegeben werden. Diese geringe Menge ist ausschlaggebend und für eine erfolgreiche Transformation essentiell. Zudem wurde entdeckt, dass der Stamm *B. subtilis* 168 nur kompetent werden kann, wenn er die Fähigkeit zur Sporulation besitzt (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Des Weiteren wurde beschrieben, dass in der gesamten Kultur, trotz dieser optimierten Methode, nur 1 bis 3,5 % der Zellen kompetent wurden.

Kompetente Zellen sind in der Lage, extrazelluläre DNA aufzunehmen. Ein Bestandteil des DNA-Aufnahmesystems ist der sogenannte Pilus (siehe Abbildung 4), der aus dem Hauptpseudopilin und Nebenspseudopilinen (grau) besteht. Diese werden durch ComC prozessiert und mit Hilfe von ComGB (Membranprotein) und ComGA (ATPase) zusammengebaut. DNA bindet dabei an den membrangebundenen Rezeptor ComEA und es kommt durch eine, ebenfalls membranständige, Endonuklease zu einer Spaltung der DNA (z.B. durch NucA). Plasmid DNA wird dadurch linearisiert. Anschließend erfolgt

eine aktive Aufnahme der DNA über das ComEC-Kanalprotein, wobei der ebenfalls beteiligte ComFA-Komplex ATP verbraucht. Bei der Aufnahme kommt es zum Abbau von einem der beiden Stränge des DNA-Doppelstrangs, so dass jeweils nur ein Einzelstrang in der Zelle erscheint. In der Zelle wird der Einzelstrang durch cytoplasmatische Proteine (z.B. SsbA, SsbB und DprA) vor dem sofortigen Abbau geschützt. Anschließend wird der Einzelstrang in das Chromosom über einen RecA-abhängigen Mechanismus integriert, sofern sich zum Chromosom homologe Regionen in der aufgenommenen DNA befinden. Die Plasmid-DNA etabliert sich dagegen extrachromosomal. Der genaue Vorgang ist in Kapitel 1.5 detailliert beschrieben.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Pseudopilus zur DNA Translokation bei der Kompetenz in *B. subtilis* (nach Chen & Dubnau, 2004; Claverys *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2004).** Der Pseudopilus, bestehend aus Pseudopilin (ComG, grau) wird mit Hilfe der Präpilin-Peptidase (ComC), dem Membranprotein (ComGB) und der ATPase (ComGA) aufgebaut. Die aufzunehmende DNA wird über den Pseudopilus an den Rezeptor ComEA gebunden. Dieser überträgt die gebundene DNA an den Kanal des cytoplasmatischen Membranproteins ComEC. Ein Strang der DNA (der andere wird abgebaut) wird aktiv mit Hilfe eines ATP-bindenden Moleküls (ComFA) durch die Membran transportiert. Im Cytosol binden Einzelstrang Bindeproteine den DNA-Strang und schützen ihn damit vor dem Abbau.

Kompetente Zellen von *B. subtilis* zeichnen sich darin aus, dass ihr Zellzyklus und deren Zellteilung verändert sind, indem die Replikation der chromosomalen DNA inhiert bzw. verzögert ist (Hamoen, 2011). Diese Wachstumsverzögerung zeigt sich, wenn kompetente Zellen in frisches Medium überführt werden. Die Blockade wird sowohl durch ComGA, welches auf die chromosomale Replikation wirkt (Haijema *et al.*, 2001), als auch durch Maf, das die Zellteilung hemmt, initiiert. Beide Proteine sind in ihrer Expression von ComK abhängig (Briley, Jr. *et al.*, 2011). Diese Verzögerung nutzen die Zellen möglicherweise, um die aufgenommene DNA in das Genom zu integrieren und

dadurch entstandene Strangbrüche zu reparieren. Vergleicht man diese Eigenschaft mit anderen natürlich transformierbaren Organismen, so ist dieses Phänomen nur bei *B. subtilis* und manchmal bei *Streptococcus pneumoniae* zu beobachten. In einer *Streptococcus pneumoniae* Kultur werden im Gegensatz zu *B. subtilis* alle Zellen kompetent (Martin *et al.*, 2010) und nach Erreichen der Kompetenz tritt ein vorübergehender Wachstumsstopp auf. Allerdings ist hierbei die Kompetenz mit der bakteriellen SOS-Antwort kombiniert (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Bei *Neisseria gonorrhoeae* ist festzustellen, dass die Zellen während der ganzen exponentiellen Wachstumsphase kompetent sind (Biswas *et al.*, 1977) und kein Wachstumsstopp zu erkennen ist, wenn sie während des Wachstums DNA aufnehmen. *Haemophilus influenza* ist transformierbar, sofern ihm entscheidende Nährstoffe fehlen (MacFadyen *et al.*, 2001). Es lassen sich aber bei den Stämmen *Haemophilus influenza* und *Vibrio cholerae* keine Wachstumshemmung und Subkulturen wie in *B. subtilis* erkennen (Lo Scudato & Blokesch, 2012). In *B. subtilis* könnte unter anderem der Wachstumsstopp, wie bei *S. pneumoniae*, mit der bakteriellen SOS-Antwort begründet werden, da bei der Transformation Strangbrüche zur Integration der DNA entstehen. Diese haben zur Folge, dass das YneA Signalpeptid aktiviert wird, wodurch die Zellteilung gehemmt wird; indem das Signalpeptid mit einem noch nicht identifizierten transmembranen Bereich interagiert (Mo & Burkholder, 2010). Hahn *et al.* äußerten dagegen die Vermutung, dass aufgrund häufig wechselnder Bedingungen im Boden die Kompetenz sich als Überlebensstrategie entwickelt hat sowie die Kopplung der *comK*-abhängige Regulation mit dem Wachstumsstopp in der Evolution zufällig oder aus ökonomischen Gründen entstanden ist (Hahn *et al.*, 2015).

### 1.3.3 Gründe der Kompetenzentwicklung

Warum wird fremde DNA von Bakterien aufgenommen? Was ist der Zweck der DNA Aufnahme? Um dies zu erklären gibt es verschiedene Hypothesen.

Eine Hypothese stützt sich auf die Funktion der DNA Reparatur (Wojciechowski *et al.*, 1988). Begründet ist dies in der beobachtbaren Hochregulierung der Reparaturgene in *B. subtilis* (Love *et al.*, 1985). Dagegen spricht jedoch, dass die aufgenommene DNA sowohl beschädigt als auch von anderen Organismen sein kann. Somit wäre diese DNA meist nicht förderlich für die Reparatur von DNA Schäden. Des Weiteren führt die



DNA Schädigung in *B. subtilis* nicht zu einer Aktivierung der Kompetenz (Redfield, 1993a).

Eine weitere Hypothese beschreibt die Kompetenz als Funktion zur Nahrungsaufnahme (Redfield, 1993b). Sie erklärt sich damit, dass die DNA aufgrund ihrer energiereichen Nukleotide aufgenommen wird (MacFadyen *et al.*, 1996; MacFadyen *et al.*, 2001; Palchevskiy & Finkel, 2006). Es ist zwar nachgewiesen, dass *B. subtilis* unter Nahrungsmangel ein kannibalisches Verhalten (González-Pastor, 2011) zeigt und unter Stress und Nahrungsmangel in der stationären Phase die Kompetenz aktiviert (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Dagegen spricht jedoch, dass nicht alle Nukleotide als Nahrung dienen. Einerseits nehmen die Zellen nur einen DNA Strang auf, andererseits wird dieser Strang, falls die aufgenommene DNA Homologien aufweist, in das Genom integriert. Im Falle von Plasmid DNA wird diese etabliert, wenn die aufgenommene DNA die Fähigkeit zur autonomen Replikation aufweist.

Die dritte Hypothese begründet die Kompetenz mit der Notwendigkeit der Rekombination. Bakterien könnten die Kompetenz als Mechanismus zur genetischen Diversität und besseren Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen nutzen (Narra & Ochman, 2006). Dagegen spricht jedoch, dass die aufgenommene DNA ebenfalls von toten Zellen stammen kann, welche aufgrund einer schlechteren Fitness nicht überleben konnten. Andererseits könnten auch Gene, wie Antibiotikaresistenzgene, aufgenommen werden, die der Zelle eindeutige Vorteile bringen können.

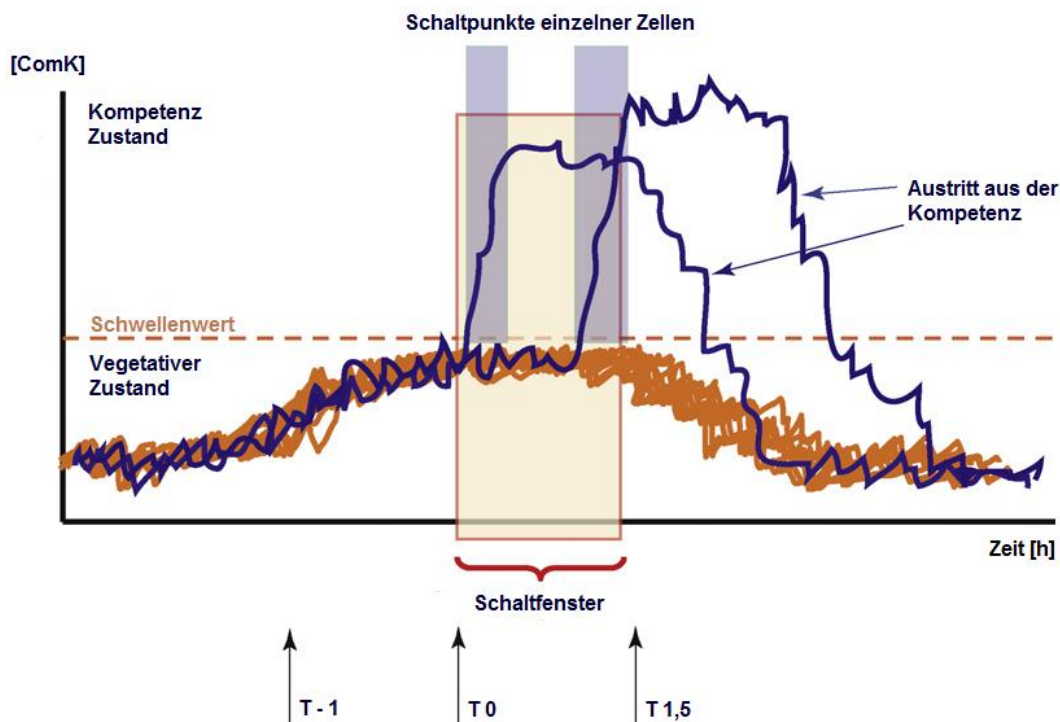
Als Fazit lässt sich sagen, dass bis heute der Grund für die Kompetenz nicht genau verstanden ist.

#### 1.4 Regulation der Kompetenz bei *B. subtilis* 168

Die Kompetenz ist in *B. subtilis* 168 sehr intensiv durch verschiedenste Regulatoren kontrolliert. ComK gilt als der Masterregulator der Kompetenz und als hauptverantwortlich für diese. Er ist ein Transkriptionsfaktor, 22 kDa groß und für das Überleben der Zelle nicht notwendig. Er aktiviert die Expression von über 100 Genen, Gene zur DNA-Rekombination, -Reparatur, -Bindung und -Aufnahme (Hamoen *et al.*, 2002; Berka *et al.*, 2002) sowie für die Zellteilung (Hamoen, 2011).

Nicht-kompetente Zellen enthalten nur sehr wenige *comK* mRNA Moleküle. Die Anzahl an ComK Proteinen steigt, wenn sich vier ComK-Moleküle zu einem ComK-Tetramer zusammen lagern und dieses Tetramer an den *comK* Promotor bindet. Diese

positive Rückkopplung führt zu einer signifikanten und sprunghaften Steigerung der ComK Konzentration in der Zelle, wodurch ein kritischer ComK Schwellenwert überschritten werden kann. Diese Überschreitung führt zur Expression ComK regulierter Gene (Leisner *et al.*, 2008) (Abbildung 5). Die Expression von *comK* tritt gewöhnlich erst am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ein, da neben ComK weitere translationale und transkriptionelle Faktoren benötigt werden.

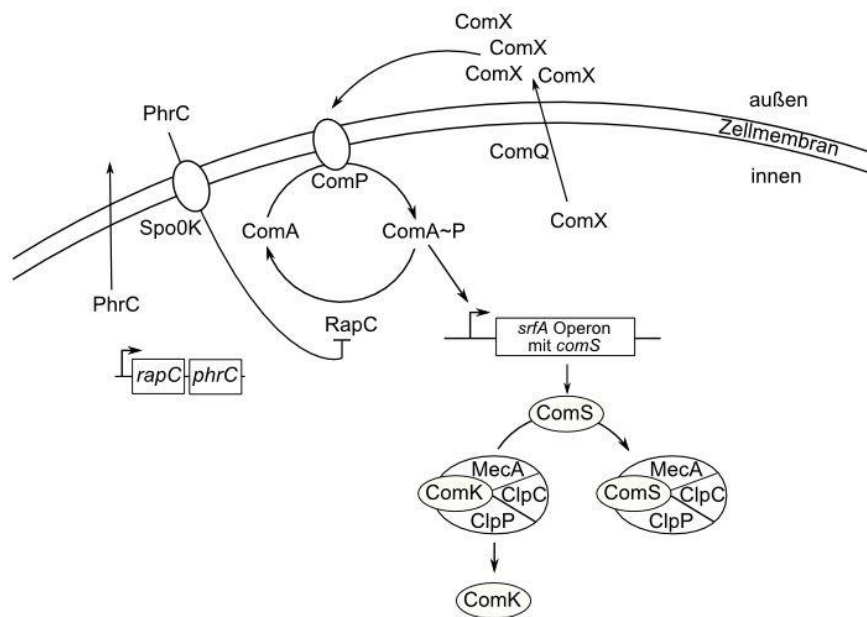


**Abbildung 5: Mechanismus der zeitlichen Kompetenzregulierung.** In der exponentiellen Wachstumsphase wird *comK* nur gelegentlich transkribiert und dessen mRNA translatiert. Dies bezeichnet man allgemein als Rauschen. Die ComK Konzentration liegt in einer Zelle weit unter dem Schwellenwert (blau und orange). Durch Quorum sensing Signale in einer Kultur und durch den Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wird die ComK Konzentration in einigen Zellen so erhöht, dass der Schwellenwert überschritten wird. Dabei kann in einzelnen Zellen (blau) ein positives Feedback ausgelöst werden, wodurch die Zellen kompetent werden. In den anderen Zellen (orange) wird der Schwellenwert nicht erreicht, wodurch es zu keinem positiven Feedback kommt und die Zellen im vegetativen Zustand bleiben bzw. sich in eine andere Richtung differenzieren. Die Periode, in der die basale *comK* Expression den Schwellenwert überschreiten kann, ist als Schaltfenster bezeichnet. Nach einer gewissen Zeit im kompetenten Zustand sinkt die ComK-Konzentration in der Zelle, sodass diese Zelle aus der Kompetenz entkommt (Abbildung aus Leisner *et al.*, 2008. Verändert, indem die Beschriftung ins Deutsche übersetzt wurde).

### 1.4.1 Translationale Regulation der Kompetenz

*B. subtilis* kann mittels Quorum sensing Mechanismen die Kompetenz regulieren. Quorum sensing beschreibt die Fähigkeit von Einzellern, über chemische Kommunikation (Signalmoleküle) die Zelldichte der Population zu messen und darüber bestimmte Gene zu aktivieren oder zu inhibieren. Das Signalmolekül ist im Falle von *B. subtilis* das Pheromon und Oligopeptid ComX (Solomon *et al.*, 1995; Solomon & Grossman, 1996). Zwei Gene, *comQ* und *comX*, werden für die Pheromonproduktion benötigt (Magnuson *et al.*, 1994). Das Gen *comX* kodiert für ein inaktives Vorläufer-Pheromon, das aus 55 Aminosäuren besteht. Die Aktivierung erfolgt dabei durch die Modifizierung des Tryptophanrest an Position 53 durch einen Prenyl-Rest. Die Modifizierung wird durch ComQ erzeugt (Ansaldi *et al.*, 2002). Zudem wird es soweit verkürzt, dass nur die letzten 10 Aminosäuren das ComX-Pheromon bilden. Das aktive Pheromon wird anschließend durch die Membran transportiert (Bacon Schneider *et al.*, 2002). Je mehr Zellen in der Kultur vorhanden sind, umso höher ist die ComX-Pheromon Konzentration im umliegenden Medium. Überschreitet die ComX Konzentration einen bestimmten Schwellenwert, wird dies von der Histidinkinase ComP wahrgenommen (Solomon *et al.*, 1995). Diese aktiviert daraufhin die Phosphorylierung von ComA (Weinrauch *et al.*, 1990). Phosphoryliertes ComA (ComA~P) ist in der Lage, an den Promotor des *srfA* Operons zu binden und dadurch die *srfA* Transkription und damit theoretisch die Surfaktin Produktion zu aktivieren (Roggiani & Dubnau, 1993). Aufgrund einer Mutation in dem Gen *sfp* für die Phosphopantetheintransferase in *B. subtilis* 168 kann jedoch kein Surfaktin produziert werden. Tatsächlich hat das Lipopetid Surfaktin per se nichts mit der Kompetenzentwicklung zu tun. Im *srfA* Operon befindet sich jedoch das Gen *comS*, das für ein 46 Aminosäuren großes Peptid kodiert. ComS ist essentiell für die Kompetenzaktivierung (D'Souza *et al.*, 1994; Sinderen *et al.*, 1995; Hahn & Dubnau, 1991), indem es den Abbau von ComK durch den Protease-Komplex aus MecA/ClpC/ClpP inhibiert (Turgay *et al.*, 1998; Prepiak & Dubnau, 2007).

Um eine zu frühe Zelldifferenzierung und Kompetenzentwicklung zu vermeiden, ist die ComK Konzentration streng reguliert. MecA erkennt spezielle hydrophobe Sequenzen (Prepiak & Dubnau, 2007) von ComK und kann an diese binden. Anschließend interagiert es mit dem Abbaukomplex ClpC/ClpP, wodurch ComK eliminiert wird. ComS verhindert diesen Abbau, indem es selbst an MecA und darüber die Bindungsstelle besetzt (Ogura *et al.*, 1999; Persuh *et al.*, 1999).



**Abbildung 6: Translationale Regulation von ComK.** ComA wird von ComP phosphoryliert, sobald es durch die erhöhte ComX-Konzentration im Medium stimuliert wird. ComA~P kann daraufhin die Expression des *srfA*-Operons und das darin liegende *comS* Gen aktivieren, indem es an dessen Promotor bindet. Üblicherweise wird ComK von dem MecA/ClpC/ClpP Protease Komplexes gebunden und abgebaut. Besetzt jedoch ComS die Bindungsstelle des MecA/ClpC/ClpP Protease Komplexes, kann ComK nicht mehr gebunden und abgebaut werden kann. Pfeile und Balken beschreiben die aktivierende und inhibierende Wirkung der Proteine (verändert nach Hamoen *et al.*, 2003b).

Ein weiterer Faktor (RapC/PhrC) reguliert das Zwei-Komponenten System ComP/ComA und wirkt darüber auf die Kompetenz. Das Besondere an dieser Proteinfamilie ist, dass ihre Aktivität über kleine sogenannte Phr Peptide reguliert wird, die wiederum ein Quorum sensing Regulationssystem bilden (Pottathil & Lazazzera, 2003). Während RapC ComA dephosphoryliert und somit negativ auf die Kompetenz wirkt, wird RapC von PhrC gehemmt (Solomon *et al.*, 1996; Core & Perego, 2003; Comella & Grossman, 2005). Neben RapC/PhrC wirken auch noch weitere Rap/Phr Systeme auf das ComP/ComA Zwei-Komponenten System (siehe Kapitel 1.4.4).

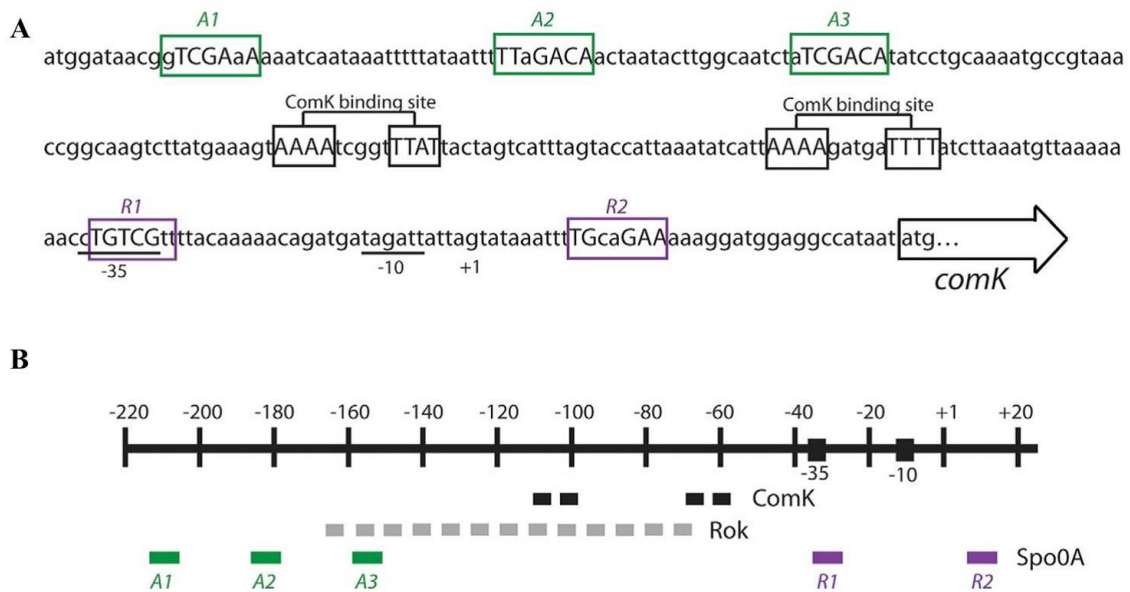
### 1.4.2 Transkriptionelle Regulation von *comK*

Die Promotorregion des *comK* Gens enthält Bindestellen für verschiedene Proteine, welche die Promotoraktivität beeinflussen und regulieren können (Abbildung 7).

ComK wirkt positiv auf seinen eigenen Promotor, indem es als Tetramer an zwei sogenannte ComK Boxen bindet. Diese liegen in der Promotorregion stromaufwärts der

-35 Region und definieren sich über AT-reiche Sequenzen (AAAAN<sub>5</sub>TTT), welche entweder 8, 18 oder 31 Nukleotide voneinander entfernt sind (Hamoen *et al.*, 1998).

Das Protein Rok (repressor of comK) dagegen hemmt die Transkription, indem es an den *comK* Promotor bindet und mit einer Region von bis zu ca. 100 bp interagiert (Smits *et al.*, 2007b). Da Rok bevorzugt an AT-reiche Sequenzen bindet und die Region mit den ComK-Boxen überlappt, kommt es zu einer Inhibierung der Transkription (Smits & Grossman, 2010). ComK dagegen wirkt als Antirepressor zu Rok, obwohl es dieses nicht von der DNA verdrängt (Smits *et al.*, 2007b).

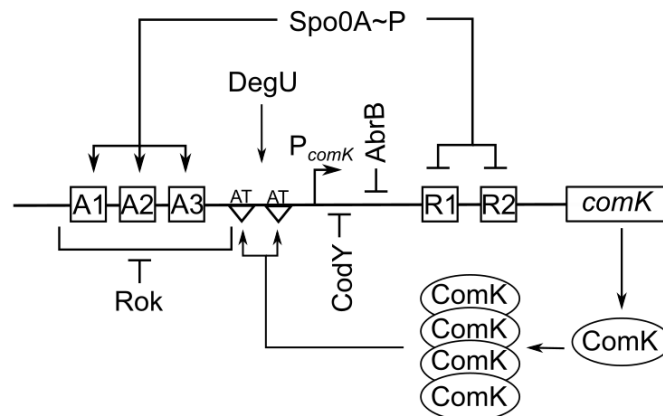


**Abbildung 7: Organisation der *comK* Promotor Region** (Übernommen aus Mirouze *et al.*, 2012). (A) Mögliche Spo0A Bindungsstellen zur Aktivierung (A1, A2 und A3) oder Hemmung (R1 und A2) sowie die beiden ComK Bindestellen (Hamoen *et al.*, 1998), -10 und -35-Region, Transkriptionsstart (+1) sowie das Startcodon von *comK* sind in der *comK* Promotorregion markiert (B) Schematische Darstellung des *comK* Promotors mit den möglichen Spo0A Bindungsstellen, ComK Boxen und der Bindungsregion von Rok (Smits *et al.*, 2007b).

Betrachtet man die in Abbildung 7 dargestellte Region, welche  $P_{comK}$  umgibt, erkennt man fünf analoge Sequenzen mit einem Spo0A~P Bindungsmotiv (tttGtCgAAaa) (Molle *et al.*, 2003; Liu, 2003). Spo0A als Masterregulator der Differenzierung wird im Folgenden genauer erläutert. Die Sequenzpositionen zeigen, dass drei Bindungsmotive (A1, A2, A3) stromaufwärts liegen, die anderen beiden Motive (R1, R2) befinden sich in, bzw. stromabwärts der -10 und -35 Region. Eine Bindung von Spo0A~P an A1 bis A3 bewirkt eine Aktivierung, eine Bindung an R1 und R2 hingegen eine Repression der *comK* Expression. Die vorhandenen Übereinstimmungen mit der Consensus-Sequenz der Spo0A~P Bindungssequenzen und ihre Lage deuten darauf hin, dass bei ansteigen-

der Spo0A~P Konzentration die Stellen A1 bis A3 gebunden und die Kompetenz aktiviert wird. Bei einem weiteren Anstieg der Spo0A~P Konzentration bindet Spo0A~P zusätzlich an R1 und R2, das zur Reprimierung der Kompetenz führt (Mirouze *et al.*, 2012).

AbrB ist ein kleines DNA bindendes Protein, das als „Transition Phase“-Regulator bekannt und für den geregelten Übergang aus dem exponentiellen in das stationäre Wachstum verantwortlich ist (Perego *et al.*, 1988; Banse *et al.*, 2008). AbrB reprimiert während der Wachstumsphase eine Vielzahl von Promotoren, deren Genexpression erst in der stationären Wachstumsphase angeschaltet werden (Strauch *et al.*, 1989). Dazu gehören verschiedene Antibiotika-Biosynthese-Gene sowie der *comK* Promotor. AbrB bindet an dessen Promotor und besetzt dadurch die RNA Polymerase Bindestelle (Schultz *et al.*, 2009). Die Expression von *abrB* selbst wird am Übergang zur stationären Wachstumsphase abgeschaltet und das in der Zelle vorhandene AbrB inaktiviert, sodass AbrB die Differenzierung nicht weiter unterbinden kann (Perego *et al.*, 1988).



**Abbildung 8: Erweiterte Organisation der *comK* Region.** Schematische Darstellung des *comK* Promotors mit den möglichen Bindungsstellen für Spo0A~P (Mirouze *et al.*, 2012), ComK (Hamoen *et al.*, 1998), Rok (Smits *et al.*, 2007b), DegU (Hamoen *et al.*, 2000), AbrB (Hamoen *et al.*, 2003a) und CodY (Serru & Sonenshein, 1996b) sowie deren Wirkung auf die Transkription. Pfeile und Balken beschreiben die aktivierende und inhibierende Wirkung der Proteine.

Der Antwort Regulator DegU wirkt initiiierend auf die *comK* Transkription, indem er die Bindung der ComK-Tetramere an die ComK-Boxen stabilisiert und damit sowohl mit ComK als auch mit der Promotorregion interagiert (Hamoen *et al.*, 2000). Damit scheint DegU für die Initiation der Kompetenz auf transkriptioneller Ebene verantwortlich zu sein und als Grundlage für die positive Rückkopplung zu dienen (Hamoen *et al.*, 2003b). Die *comK* Expression ist zusätzlich sensitiv gegenüber der Aminosäure Zu-

sammensetzung im Medium. Der Transkriptionsfaktor CodY misst die intrazelluläre GTP Konzentration und dient als Indikator für die Nahrungsbedingungen im Medium. Bei ausreichender GTP Konzentration besetzt CodY die RNA-Polymerasen Bindungsstelle des *comK* Promotors und hemmt die *comK* Expression, bis die Zellen ihre stationäre Wachstumsphase erreichen (Serror & Sonenshein, 1996b, 1996a; Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001).

### 1.4.3 Regulation der zellulären ComK Konzentration

Neben den genannten Aktivatoren und Repressoren von *comK* gibt es noch eine Reihe weiterer Faktoren, welche die Kompetenzbildung beeinflussen. Sigma-Faktoren sind Proteine, die für die Initiation der Transkription notwendig sind und je nach Umweltbedingungen exprimiert werden. Bisher sind in *B. subtilis* 10 Sigmafaktoren sowie 7 alternative Sigmafaktoren mit zusätzlichen cytoplasmatischen Funktionen (ECF) bekannt (siehe Tabelle 2). Die ECF Sigma Faktoren sind kleine regulatorische Proteine, die sich in ihrer Sequenz zu anderen Sigmafaktoren deutlich unterscheiden (Helmann, 2002). Bisher ist noch sehr wenig über sie bekannt (Mascher, 2013).

Der Sigmafaktor A ( $\sigma$ A) ist ein *housekeeping* Faktor und aktiviert die Transkription jener Gene, deren Genprodukte unter gewöhnlichen Umweltbedingungen benötigt werden. Zudem ist er in die Geneexpression der frühen Sporulationsphase involviert (Dubnau, 1991). Der Sigmafaktor H ( $\sigma$ H) ist wichtig für die Transkription von Genen, deren Genprodukte in der Übergangsphase von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase wirken. Zudem ist er an der Initiierung der Sporenbildung beteiligt (Albano *et al.*, 1987; Carter, III & Moran, Jr., 1986), ebenso wie an der Kompetenzaktivierung (Dubnau, 1991; Jaacks *et al.*, 1989; Siranosian & Grossman, 1994). Des Weiteren wirkt er auf die Transkription von verschiedenen Mitgliedern der *phr* Genfamilie, die für zu sekretierende Peptid Pheromone codieren (siehe Kapitel 1.4.4) (Lazazzera *et al.*, 1999; McQuade *et al.*, 2001).

**Tabelle 2: Allgemeine und ECF Sigmafaktoren in *B. subtilis* und ihre Funktionen (Helmann, 2002; Souza *et al.*, 2014)**

Sigmafaktoren	Funktion
$\sigma A$	frühe Sporulation, <i>housekeeping factor</i>
$\sigma B$	allgemeine Stressantwort
$\sigma D$	Expression der Gene von Chemotaxen, Autolysinen, Flagellen
$\sigma E$	Sporulation (Genexpression in der frühen Mutterzelle)
$\sigma F$	Sporulation (Genexpression in der frühen Vorläuferspore)
$\sigma G$	Sporulation (Genexpression in der späten Vorläuferspore)
$\sigma H$	postexponentielle Genexpression (Kompetenz- und Sporulationsgene)
$\sigma I$	RNA Polymerase Sigma Faktor
$\sigma K$	Sporulation (Genexpression in der späten Mutterzelle)
$\sigma L$	Expression von degradativen Enzymen
$\sigma M$	ECF Sigma Faktor, Genexpression bei zu hoher Salzkonzentration, Zellwandantibiotika, Hitzeschock und Ethanol
$\sigma V$	ECF Sigma Faktor, Lysozym Stressantwort
$\sigma W$	ECF Sigma Faktor, Vermittlung von Transkriptionsantwort bei Zellwandstress und Detoxifikation
$\sigma X$	ECF Sigma Faktor, Kontrolle der Zellwandmodifikationsprozesse, Biofilmbildung
$\sigma Y$	ECF Sigma Faktor, Produktion von und Resistenz gegen Sublancin Antibiotikum
$\sigma YlaC$	ECF Sigma Faktor, Oxidative Stressantwort
$\sigma Z$	ECF Sigma Faktor

Gamba *et al.* (2015) haben ein weiteres Protein entdeckt, das neben den Aktivatoren, Repressoren und Sigmafaktoren einen Einfluss auf die *comK* mRNA hat. Das Protein Kre (ComK Repressor) reduziert die Menge an ComK, indem es negativ auf die Stabilität der *comK* mRNA wirkt. Kre und ComK bilden dabei eine doppelt negative Feedback-Schleife, die typisch für die Kontrolle einer bistabilen Genexpression ist (Gamba *et al.*, 2015). Möglicherweise modifiziert Kre die Aktivität von einer der Endo- oder Exoribonukleasen, welche die Degradation und Prozessierung der RNA in *B. subtilis* koordinieren (Kampf & Stülke, 2015).



#### 1.4.4 Antwortregulator Aspartat Phosphatasen (Rap) und ihre Wirkung auf die Kompetenz

In *B. subtilis* besteht die Rap-Familie aus elf chromosomal kodierten Rap-(Phr) Systemen (Perego & Brannigan, 2001; Meijer *et al.*, 1998). Andere Stämme können jedoch weitere homologe plasmidkodierte Rap-Phr Systeme aufweisen (Koetje *et al.*, 2003). RapA, -B, -E, -H und -J sind „Antwortregulator Aspartat Phosphatasen“ (Rap). RapC, -F, -G und -H sind Transkriptions-Inhibitorproteine, die unter anderem die Phosphorylierung der Antwortregulatoren ComA oder DegU beeinflussen (Smits *et al.*, 2007a; Core & Perego, 2003; Bongiorno *et al.*, 2005; Ogura *et al.*, 2003). All diese Proteine haben Protein-Protein-Interaktions-Module, sogenannte TRPs-Motive (Tetratricopeptid Wiederholungen). Die Sequenzen für die *phr* Propeptide befinden sich am 3' Ende des entsprechenden *rap* Gens und bilden damit *rap-phr* Kassetten.

**Tabelle 3: Übersicht über die Rap-Phr Proteinfamilie und deren jeweilige Funktion in der Zelle.**

Rap Protein	Phr Peptid	Funktion
<b>RapA</b>	PhrA	dephosphoryliert Spo0F~P
<b>RapB</b>		dephosphoryliert Spo0F~P
<b>RapC</b>	PhrC	hemmt die DNA-Bindungsaktivität von ComA~P
<b>RapD</b>		hemmt die DNA-Bindungsaktivität von ComA~P
<b>RapE</b>	PhrE	dephosphoryliert Spo0F~P
<b>RapF</b>	PhrF	hemmt die DNA-Bindungsaktivität von ComA~P
<b>RapG</b>	PhrG	hemmt die DNA-Bindungsaktivität von DegU~P
<b>RapH</b>	PhrH	dephosphoryliert Spo0F~P und hemmt die DNA-Bindungsaktivität von ComA~P
<b>RapI</b>		hemmt die DNA-Bindungsaktivität von ImmR
<b>RapJ</b>	PhrJ	dephosphoryliert Spo0F~P
<b>RapK</b>	PhrK	hemmt die DNA-Bindungsaktivität von ComA~P

Im Allgemeinen verhindern die Rap-Proteine eine Differenzierung von Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase, indem sie die Phosphorylierung von Spo0A verhindern bzw. die Phosphorylierung nachgeschalteter Transkriptionsfaktoren wie ComA kontrollieren. Ihre Aktivität wird über kleine Peptide (Phr), sogenannte Phosphat Regulatoren, reguliert. Diese werden als Vorläufer Moleküle über einen Sec-abhängigen Exportmechanismus aus der Zelle geschleust, wobei das Signalpeptid von einer Signalpep-

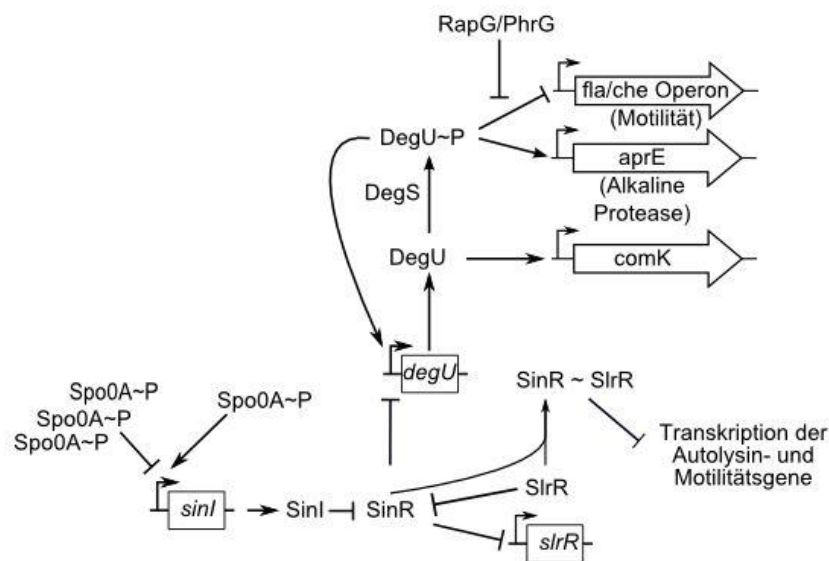
tidase entfernt wird. Anschließend werden die Phr Peptide wieder in die Zelle aufgenommen. RapC, als Beispiel, hemmt üblicherweise ComA~P, indem es die DNA-Bindungsaktivität blockiert (Core & Perego, 2003). Liegt nun eine geringe PhrC-Signalpeptid Konzentration in der Zelle vor, hemmt das PhrC Signalpeptid die RapC Phosphatase. Dadurch kann ComA~P wieder an die DNA binden, wodurch die Expression des *srfA* Operons aktiviert wird. Eine hohe PhrC Signalpeptid Konzentration wiederum hemmt ComA~P direkt, der genaue Mechanismus dafür ist jedoch nicht bekannt (Parashar *et al.*, 2013; Pottathil & Lazazzera, 2003).

#### 1.4.5 Einfluss multizellulären Verhaltens auf die Kompetenz

Um die Bistabilität von *B. subtilis* in der postexponentiellen Phase zu koordinieren, sind sogenannte Zwei-Komponenten Signal Transduktionssysteme notwendig. Diese bestehen üblicherweise aus einer Kinase und einem Antwortregulator. Die Kinase nimmt Signale wie z.B. Stress wahr und der Antwortregulator im Zytoplasma der Zelle kontrolliert neben der zellulären Antwort ebenfalls die Gentranskription. Im Fall der Kompetenz Aktivierung und -Inhibierung, aber auch bei den anderen Prozessen in der postexponentiellen Wachstumsphase spielt das Zwei-Komponentensystem aus DegS (Histidinkinase) und DegU (Antwortregulator) eine wichtige Rolle (Mascher *et al.*, 2006; Dubnau *et al.*, 1994; Kunst *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 2009). Sowohl phosphoryliertes als auch dephosphoryliertes DegU zeigt eine regulatorische Aktivität. So wirkt DegU zum einen Transkription initiiierend, indem es die *comK* Expression durch die Bindung von ComK-Tetramere an den *comK* Promotor aktiviert. Zum anderen wirkt es als Antirepressor für Rok und CodY am *comK* Promotor. DegU~P dagegen dient als Regulator und beeinflusst die Expression von über 170 Genen (Mäder *et al.*, 2002; Kobayashi, 2007) bei verschiedenen Wachstumsbedingungen. Dies entspricht ~ 4 % des Genoms.

Das *degSU* Operon weist drei Promotoren auf (Veening *et al.*, 2008b). Der erste Promotor liegt stromaufwärts von *degS* und dient zur Expression von *degS* und *degU*. Der zweite Promotor befindet sich in der codierenden Sequenz von *degS* und führt dazu, dass die Menge an DegU unter Stickstoffmangel steigt. Der dritte Promotor liegt zwischen *degS* und *degU* und wird aktiviert, sobald DegU in phosphorylierter Form vorliegt (Veening *et al.*, 2008a; Yasumura *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung von DegU erfolgt über DegS. In den meisten *B. subtilis* Stämmen wird diese noch durch das Pro-

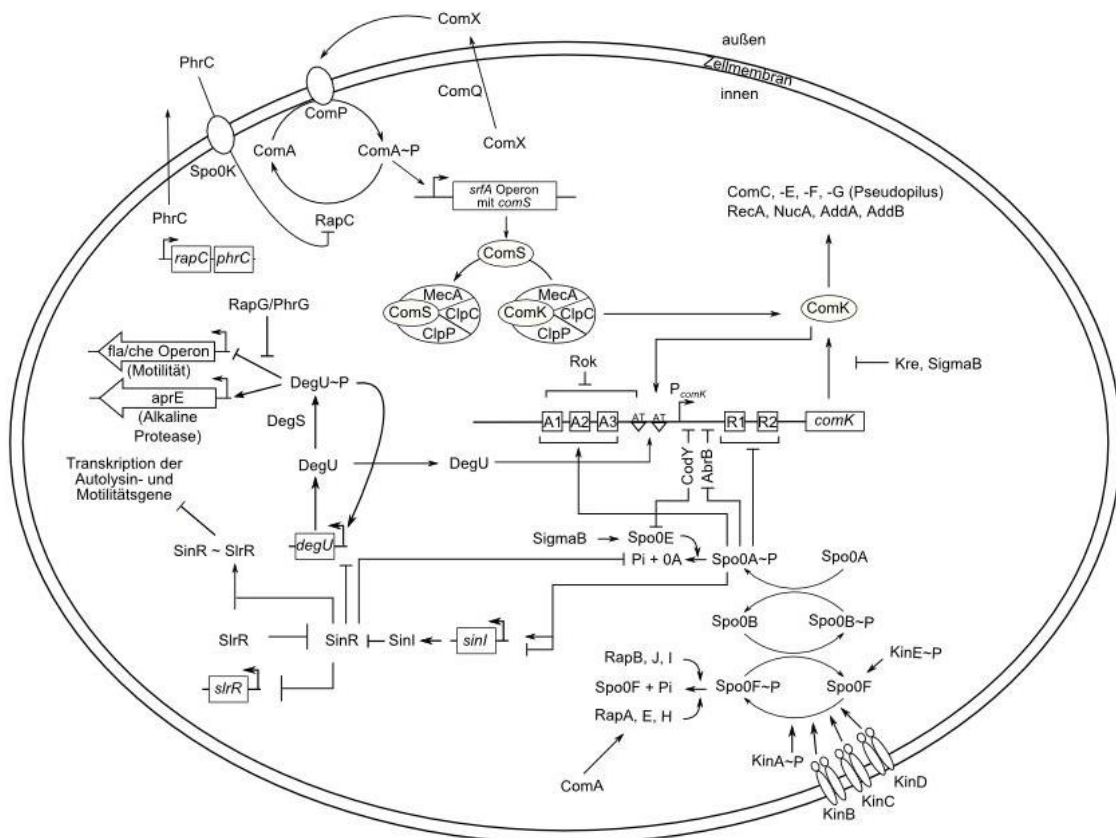
tein DegQ verstärkt (Kobayashi, 2007). Der Stamm *B. subtilis* 168 weist jedoch eine Mutation in dem *degQ* Promotor auf (in der -10 Region), wodurch das Gen nicht exprimiert werden kann. Diese Punktmutation ist eine der genetischen Unterschiede zwischen den Wildtyp-Stämmen und dem Laborstamm *B. subtilis* 168, die das multizelluläre Verhalten offensichtlich beeinflusst (Stanley & Lazazzera, 2005). Möglicherweise ist dies auch der Grund, warum *B. subtilis* 168 die Kompetenz häufiger ausbildet als ein vergleichbarer Wildtyp-Stamm.



**Abbildung 9: Regulation der *degU* Genexpression und die daraus resultierende Wirkung auf die Kompetenz.** SinR, das durch SinI und SlrR reprimiert wird, wirkt negativ auf die *degU* Genexpression (Kobayashi, 2008; Chai *et al.*, 2010). DegU~P kann jedoch an seinen eigenen Promotor binden, was zur Genexpression führt. Im phosphorylierten Zustand aktiviert DegU zusätzlich die Genexpression von *aprE* (Protease), aber hemmt die Expression des *fla/che* Operons (Motilität) (Mäder *et al.*, 2002; Kobayashi, 2007). Dephosphoryliert unterstützt DegU die ComK-Tetramer Bindung an den ComK-Promotor, das zur Initiation der Kompetenz führt (Hamoen *et al.*, 2000). Pfeile und Balken beschreiben die aktivierende und inhibierende Wirkung der Proteine.

Die *degU* Expression wird zusätzlich von den beiden homologen Proteinen SinR (Transkriptionsregulator) und SlrR (Transkriptionsaktivator) reguliert. Diese wiederum regulieren sich gegenseitig, indem sie eine zweifache negative Rückkopplungsschleife bilden. Einerseits hemmt SlrR die DNA Bindungsaktivität von SinR, indem es dieses bindet, andererseits unterdrückt SinR die *slrR* Expression (Kobayashi, 2008; Chai *et al.*, 2010). Welches Protein in der Rückkopplung dominant ist, entscheidet SinI, der Anta-

gonist von SinR, indem es mit SinR interagiert (Bai *et al.*, 1993). Die Expression von *sinI* ist dabei von der Menge an Spo0A~P abhängig (Shafikhani *et al.*, 2002). Wenn SlrR dominant ist, assoziiert dieses mit SinR und bildet ein Heterodimer, das Autolysin- und Motilitätsgene (*motAB*, *mcpABC*, *lytABC*, *lytF*) unterdrückt, aber die Kompetenz verstärkt. Wenn SinR dominant ist, hemmt dies die Biofilmbildung. Zudem kann es hemmend auf die Kompetenz wirken, indem es die Expression von DegU unterdrückt (Ogura *et al.*, 2014).



**Abbildung 10: Übersichtsdarstellung der Kompetenzentwicklung in *B. subtilis* 168.** Zusammenfassung der Abbildungen 3, 6, 8 und 9. Pfeile und Balken beschreiben die aktivierende und inhibierende Wirkung der Proteine.

### 1.5 Etablierung chromosomaler – und Plasmid DNA bei der Transformation einer Zelle

Das Bakterium *B. subtilis* kann im Schnitt 12 kb lange einzelsträngige DNA-Fragmente aufnehmen (Dubnau, 1999). Während der Transformation mit chromosomaler DNA werden die Enden der einzelsträngigen DNA durch die Proteine SsbB, SsbA und RecN vor dem Abbau geschützt. Die DNA wird erst abgebaut, wenn keine Homologie in der

chromosomalen DNA bzw. im selbstreplizierenden Molekül von RecA gefunden wurde. Der Homologieabgleich unterteilt sich dabei in drei Schritte. Zunächst kommt es zur Bindung von RecA an das einzelsträngige DNA-Fragment, anschließend wird die doppelsträngige DNA entwunden und die Stränge voneinander getrennt. Das 3'-Ende der einzelsträngigen DNA wird in den homologen Bereich eingebracht. Zum Schluss wird die Paarung des komplementären Stranges verlängert, sodass sich ein dreisträngiges Intermediat (D-Schleife) bildet (Claverys & Lacks, 1986).

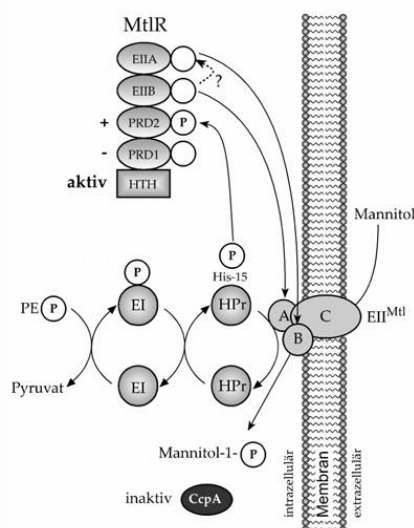
Eine Transformation mit Plasmid DNA ist dann erfolgreich, wenn sich das Plasmid in der neuen Wirtszelle etablieren kann. In der Literatur von Stewart & Carlson (1986), Sanchez *et al.* (2007) und Yadav *et al.* (2012) ist dieser Prozess als RecA unabhängig beschrieben. Die molekulare Basis der Plasmidetablierung ist bisher nur wenig verstanden. Momentan gibt es zwei gegensätzliche Modelle. Laut des ersten Modells wird nur ein lineares einzelsträngiges multimeres DNA-Fragment aufgenommen. Dieses Fragment dient als Matrize und wird über einen Replikations-Mechanismus in eine doppelsträngige Form überführt und zirkularisiert (Saunders & Guild, 1981). Das zweite Model thematisiert die Aufnahme zweier komplementärer Stränge, die sich mit Hilfe von RecO oder DprA aneinanderlagern. Die entstehenden Lücken werden aufgefüllt und über Ligasen miteinander verknüpft (de Vos *et al.*, 1981). Im Vergleich zur Transformation von chromosomaler DNA zeigt die Transformation mit Plasmid DNA eine ~100-fach geringere Transformationseffizienz (Canosi *et al.*, 1978). Zudem ist laut Literatur die Transformation mit Plasmiden in Monomerkonformation nicht möglich (Eisenstein *et al.*, 1977; Notani *et al.*, 1981).

## 1.6 Expressionssystem zur Kompetenzaktivierung

*B. subtilis* kann zahlreiche Mono- und Disaccharide als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Bei vielen Zuckern erfolgt die Aufnahme über das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem (PTS). Dabei wird über eine Enzymkaskade der Phosphatrest des Phosphoenolpyruvats (PEP) in energiereicher Form auf ein Substrat übertragen, das meist eine Hexose (Glucose, Mannose, Fructose) oder ein Zuckeralkohol (Glucitol, Mannitol) ist. Das Substrat wird über ein Membranprotein in das Zytoplasma eingeschleust und direkt bei der Aufnahme phosphoryliert. Dies geschieht unter Beteiligung der Enzyme Enzym I (EI), dem Histidin-haltigen Protein (HPr) und dem Zuckertransporter EII, welcher substratspezifisch ist (Fuchs *et al.*, 2007).

### 1.6.1 Das D-Mannitol-Expressionssystem

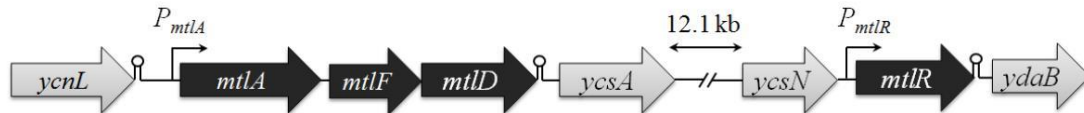
Die Aufnahme von D-Mannitol erfolgt in *B. subtilis* über die C-Domäne des  $EII^{Mtl}$ . D-Mannitol wird durch die Membran transportiert und dabei von der B-Domäne des  $EII^{Mtl}$  phosphoryliert. Dieses Phosphat wird durch das cytoplasmatische Protein  $EIIA^{Mtl}$  zur Verfügung gestellt, welches wiederum durch HPr (H15~P) phosphoryliert wird (Abbildung 11). Anschließend wandelt die Mannitol-1-Phosphat Dehydrogenase das aufgenommene Mannitol 1-Phosphat in Fructose 6-Phosphat um, welches ein Zwischenprodukt der Glykolyse ist. Das Mannitol Verwertungssystem besteht aus dem *mtlAFD* Operon, das im Chromosom von *B. subtilis* lokalisiert (Abbildung 12) ist. Das erste Gen, *mtlA*, kodiert für das  $EIICB^{Mtl}$  Protein (Kunst *et al.*, 1997). Das *mtlF* Gen kodiert für den cytoplasmatischen Phosphocarrier,  $EIIA^{Mtl}$  (Barbe *et al.*, 2009; Joyet *et al.*, 2010).



**Abbildung 11: PTS vermittelte Aufnahme von Mannitol in *B. subtilis* (nach Wenzel, 2013).** Mannitol wird über  $EII^{Mtl}$  in die Zelle aufgenommen und dabei über die EIIB-Domänen zu Mannitol-1-Phosphat phosphoryliert. Die Phosphorylierung der PRD2-Domäne des Aktivators MtlR durch HPr-His-15~P führt zur Dimerisierung des Aktivators MtlR, der an den Operator des *mtl* Operon bindet.

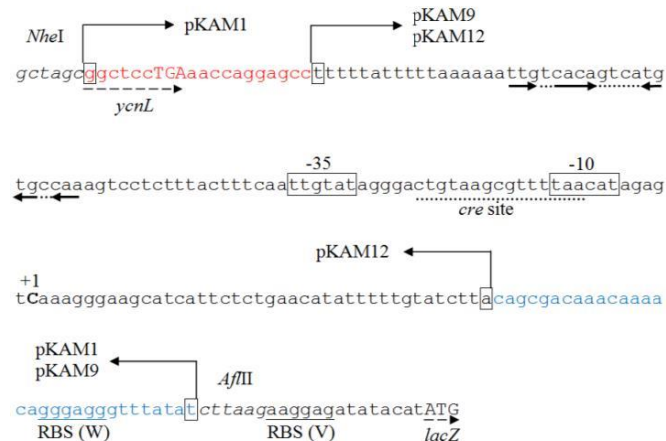
Am Ende des Operons befindet sich das *mtlD* Gen, das für die Mannitol 1-Phosphat Dehydrogenase kodiert (Barbe *et al.*, 2009; Kunst *et al.*, 1997). Aktiviert wird die Transkription des Operons über den Transkriptionsaktivator, MtlR, dessen *mtlR* Gen 14,4 kb stromabwärts des *mtlAFD* Operons liegt und an den Promotor  $P_{mtlA}$  bindet (Harwood & Wipat, 1996; Reizer *et al.*, 1999; Reizer *et al.*, 1992).

In der folgenden Arbeit wurde eine Reihe von Genen über das Mannitol Regulationssystem exprimiert. Als Promotor diente dabei der in der *leader*-Sequenz 3' verkürzte Promotor  $P_{mtlA}$  aus dem Stamm *B. subtilis* 3NA (Heravi *et al.*, 2011).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des *mtlAFD*-Operons zur Aufnahme von Mannitol (Heravi, 2013).** Das *mtlAFD* Operon besteht aus *mtlA* (EIICB<sup>Mtl</sup> Protein), *mtlF* (cytoplasmatischer Phosphocarrier EIIA<sup>Mtl</sup>) und *mtlD* (Mannitol 1-Phosphat Dehydrogenase) (Barbe *et al.*, 2009; Joyet *et al.*, 2010; Kunst *et al.*, 1997). Das Gen *mtlR* ist ein Transkriptionsregulator und bindet in Anwesenheit von Mannitol an  $P_{mtlA}$ , wodurch das *mtlAFD*-Operon exprimiert wird (Heravi, 2013).

Dieser Promotor wurde in der Promotionsarbeit von Kambiz Morrabi Heravi getestet. Dafür wurde der Promotor in unterschiedlichen Längen zusammen mit dem Reporter gen *lacZ* in Plasmide integriert und mittels  $\beta$ -Galaktosidase Assays getestet. Der native  $P_{mtlA}$  ist 181 bp lang (Abbildung 11) und enthält sowohl die Kernelemente eines Promotors (+1, -10 und -35 Sequenz) als auch regulatorische Sequenzen (Operator und *cre* sites). Der Promotor in pKAM12 ist am 5'-Ende um 20 bp verkürzt, sodass auch der Terminator des *ycnL*-Gens nicht mehr vorhanden ist. Zudem wurde am 3'-Ende die ribosomale Bindungsstelle, RBS (W), entfernt und durch eine Bindungsstelle, RBS (V), aus dem Plasmid pSUN279.2 ersetzt. Da dieser Promotor in  $\beta$ -Galaktosidase Assays eine deutliche Aktivitätssteigerung im Vergleich zum WT-Promotor und anderen Promotorvarianten zeigte (Heravi, 2013), wurde er in dieser Arbeit verwendet.



**Abbildung 13: Sequenz des Promotors  $P_{mtlA}$  und daraus verwendete Promotorvarianten (übernommen aus Heravi, 2013).** Anfang und Ende der Promotoren sind mit Pfeilen und Kästen markiert. Die ribosomale Bindungsstelle (RBS) von  $P_{mtlA}$  (W) und pSUN279.2 (V) sind unterstrichen. In dieser Arbeit wurde die Promotorvariante verwendet, die mit pKAM12 markiert ist.

## 1.7 Zielsetzung

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Verbesserung der Transformationsrate von *B. subtilis* 168. Vorausgegangene Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass eine zusätzliche Expression von Genen, die die Kompetenzentwicklung positiv beeinflussen, zur Steigerung der Transformationsrate führt und zusätzlich die Transformation in LB-Medium durchgeführt werden kann.

In dieser Arbeit sollte sowohl ein *B. subtilis* 168 Stamm generiert werden, der eine chromosomal integrierte induzierbare Kompetenzkassette aus mehreren Genen enthält als auch ein optimiertes Protokoll, das die Transformationsrate in diesem Stamm deutlich steigert. Die Bestätigung erfolgte über die Zahl an positiven Kolonien pro Milliliter und mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie. Des Weiteren konnte dieser Stamm mit Plasmid-DNA in monomerer Konformation erfolgreich transformiert werden.

Die deutliche Steigerung der Transformationsrate führte zu der Frage, ob die Kompetenz, in dem in der Transformationsrate gesteigerten Stamm REG19, unabhängig von den natürlichen kompetenzinitiierenden Genen aktiviert werden kann. Die Transformationsversuche zeigten, dass der Stamm REG19 im kompetenten Zustand eine Wachstumshemmung aufweist, sobald er in frisches Medium überführt wurde. Daher wurden verschiedenen Gene deletiert, die möglicherweise einen Einfluss auf die Wachstumshemmung haben. Weitere Deletionsanalysen wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Kompetenzregulation in dem Stamm REG19 genauer zu verstehen und die Transformationsrate weiter zu steigern.

Darüber hinaus ermöglichte die gesteigerte Transformationsrate von REG19 einerseits die Untersuchung der Etablierung von Plasmid-DNA nach der Transformation, andererseits ob eine Transformation eines Genes mit nicht selektionierbaren Eigenschaften mit Hilfe einer Kotransformation möglich ist. Zum Schluss stellte sich die Frage, ob eine Deletion chromosomaler Genen ohne die Verwendung von Plasmid-DNA in REG19 möglich ist.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

#### 2.1.1 Bakterienstämme

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten, nicht-selbstständig hergestellten Stämme mit Referenzen aufgelistet. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die Konstruktion der in dieser Arbeit generierten Stämme ausgehend von dem Stamm *B. subtilis* 168.

**Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Stämme mit relevantem Genotyp.**

Antibiotikaresistenzgene: *ermC* = rRNA Methyltransferase (Erythromycin); *cat* = Chloramphenicol Acetyltransferase, *aad9* = Spectinomycin Adenyltransferase

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(rk<sup>-</sup>,mk<sup>+</sup>), relA1,supE44, Δ(lac-proAB), F<sup>+</sup>[traD36, proAB, lacI<sup>q</sup> lacZ ΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
NM538	<i>F supF hsdR mcrB λ<sup>-</sup></i>	Frischauf <i>et al.</i> , 1983
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	DSM23778 <sup>2</sup>
3NA	<i>spo0A3</i>	Michel & Millet, 1970
ΠG-Bs168-1	<i>trpC2, ΔmanPA::ermC</i>	pJOE6577.1→168
KM0	<i>trpC<sup>+</sup></i>	pKAM041→168 Heravi Rahmer <i>et al.</i> , 2015
BKE03500	168 <i>ΔcomS::ermC</i>	Bacillus Genetic Stock Center
BKE10420	168 <i>ΔcomK::ermC</i>	Bacillus Genetic Stock Center
BKE10630	168 <i>ΔaddA::ermC</i>	Bacillus Genetic Stock Center
BKE11310	168 <i>ΔcomZ::ermC</i>	Bacillus Genetic Stock Center
BKE11520	168 <i>ΔmecA::ermC</i>	Bacillus Genetic Stock Center
BKE11820	168 <i>ΔyneA::ermC</i>	Bacillus Genetic Stock Center
BKE16940	168 <i>ΔrecA::ermC</i>	Bacillus Genetic Stock Center

<sup>2</sup> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

**Tabelle 5: In dieser Arbeit konstruierte und verwendete *B. subtilis* 168 Stämme mit relevantem Genotyp.**

Antibiotikaresistenzgene: *ermC* = rRNA Methyltransferase (Erythromycin); *cat* = Chloramphenicol Acetyltransferase, *aad9* = Spectinomycin Adenyltransferase

Stamm	Relevanter Genotyp	Konstruktion
REG1	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>hisI'</i> - <i>aad9</i> - <i>yvcA</i>	pHM30→IIG-Bs168-1
REG3	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comS</i>	pREG3→REG1
REG4	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-dprA</i>	pREG4→REG1
REG5	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-dprA</i> , <i>comS</i>	pREG5→REG1
REG6	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK</i>	pREG6→REG1
REG7	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-dprA-comK</i>	pREG7→REG1
REG19	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i>	pJOE7361.1→REG1
REG19.1	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i>	pJOE7644.2→REG19
REG32	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>srfAA-AD</i>	pREG12→REG19
REG33	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>comK</i>	pREG13→REG19
REG35	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>comK</i> , $\Delta$ <i>srfAA-AD</i>	pREG13→REG32
REG36	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>spo0A/spoIVB</i>	pJOE7122→REG19
REG37	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>comQXPA</i>	pREG10→REG19
REG45	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>maf</i>	pREG14→REG19
REG47	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>comGA</sub>-eGFP::yuaB</i>	pREG18→IIG-Bs168-1
REG48	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , <i>P<sub>comGA</sub>-eGFP::yuaB</i>	pREG18→REG19
REG54	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>abrB</i>	pREG21→REG19
REG57	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>sinR</i>	pREG22→REG19
REG63	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>dprA</i>	pREG28→REG19
REG65	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>recJ</i>	pREG25→REG19
REG67	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>srfAA-AD</i> , $\Delta$ <i>comQXPA</i>	pREG10→REG32
REG71	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>sinI</i>	pREG33→REG19
REG73	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>rok</i>	pREG38→REG19
REG75	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>spo0B</i>	pJOE8068→REG19
REG89	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>licB</sub>-comK-comS</i>	pREG37→REG1
REG98	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>kinC</i>	pREG43→REG19
REG100	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>kinB</i> , $\Delta$ <i>spo0B</i>	pREG43→REG75
REG102	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>rapH/phrH</i>	pREG54→REG19
REG104	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>rapC/phrC</i>	pREG56→REG19
REG106	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , <i>comGA-eGFP-comGB</i>	pREG50→REG19
REG110	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>kinB</i>	pREG62→REG19
REG112	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>rapGphrG</i>	pREG70→REG19
REG114	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , $\Delta$ <i>fisH</i>	pREG72→REG19
REG116	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , <i>P<sub>mtlA</sub>-comK-comS</i> , <i>mecA'</i> - <i>cat</i> - <i>mecA</i>	pREG45→REG19

Stamm	Relevanter Genotyp	Konstruktion
REG117	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>recA::cat</i>	pREG47→REG19.1
REG120	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>degU</i>	pREG58→REG19
REG125	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>sinI</i> , $\Delta$ <i>degU</i>	pREG33→REG120
REG127	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>slrR</i>	pREG74→REG19
REG131	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>comS::ermC</i>	Chrom. DNA BKE03500→REG19.1
REG136	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>yneA::ermC</i>	Chrom. DNA BKE11820→REG19.1
REG138	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>addA::ermC</i>	Chrom. DNA BKE10630→REG19.1
REG143	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>comZ::ermC</i>	Chrom. DNA BKE11310→REG19.1
REG144	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>comS</i>	pJOE6732→REG19.1
REG146	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comS</i>	pREG3→REG19.1
REG147	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>dprA</i>	pREG4→REG19.1
REG148	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>dprA</i> , <i>comS</i>	pREG5→REG19.1
REG149	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK</i>	pREG6→REG19.1
REG151	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>comS</i> , $\Delta$ <i>comK::ermC</i>	Chrom. DNA BKE10420→REG144
REG154	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{comK-comK::P_{licB-comK-comS}}$	pREG84→REG1
REG159	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{licB-comK-comS}$ , $\Delta$ <i>comK</i>	pREG13→REG89
REG165	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>kre::cat</i>	Gibson2→REG19
REG165.1	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>kre</i>	pJOE6732→REG165
REG166	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>sigB::cat</i>	Gibson3→REG19
REG166.1	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>sig</i>	pJOE6732→REG166
REG167	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>sigD::cat</i>	Gibson4→REG19
REG167.1	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>sigD</i>	pJOE6732→REG167
REG169	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-dprA</i> , $\Delta$ <i>recA::cat</i>	pREG47→REG7
REG170	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>rapA/phrA::cat</i>	Gibson5→REG19
REG171	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>manPA::ermC</i> , $P_{m1A}$ - <i>comK-comS</i> , $\Delta$ <i>rapA/phrA</i>	pJOE6732→REG170

### 2.1.2 Plasmide

Tabelle 6 zeigt die verwendeten, nicht selbst hergestellten Plasmide mit den jeweiligen Referenzen. In Tabelle 7 sind die Konstruktionen der in dieser Arbeit selbständig hergestellten Plasmide aufgelistet. Relevante Plasmidkarten sind im Anhang (Kapitel 6.1) skizziert.

**Tabelle 6: Verwendete Plasmide mit relevanten Eigenschaften.** Abkürzungen: KV = Klonierungsvektor; IV = Integrationsvektor; Amp = Ampicillin; Cm = Chloramphenicol; Erm = Erythromycin; Spc = Spectinomycin; Km = Kanamycin; n.v. = nicht veröffentlicht.

Name	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pHM30	IV für <i>B. subtilis</i> ( <i>his</i> -Operon)	Amp, Spc	Motejadded & Altenbuchner, 2007
pHM31	KV für <i>B. subtilis</i> ( <i>his</i> -Operon)	Amp	Motejadded & Altenbuchner, 2007
pJOE4370	KV für pWAL275	Amp, Km	Altenbuchner, J.; n.v.
pJOE4786.1	KV für PCR Produkte	Amp	Jeske & Altenbuchner, 2010
pJOE6577.1	<i>aad9</i> , <i>bla</i> , <i>manPA::ermC</i>	Amp, Spc, Erm	Wenzel & Altenbuchner, 2015
pJOE6732	Instabiler IV für <i>B. subtilis</i> ; P <sub>xyLAB-cre</sub>	Amp, Spc	Altenbuchner, J.; n.v.
pJOE6743	KV für Deletionen in <i>B. subtilis</i> <i>manP</i> -Gegenselektion	Amp, Spc	Wenzel & Altenbuchner, 2015
pJOE6905	KV für P <sub>mlA-comK</sub> als Template	Amp	Rahmer <i>et al.</i> , 2015
pJOE7122	IV für <i>spo0A/spoIVB</i> -Deletion in <i>B. subtilis</i>	Amp, Spc	Rahmer <i>et al.</i> , 2015
pJOE7331	KV für pJOE7361 (P <sub>mlA-comK-comS</sub> )	Amp	Rahmer <i>et al.</i> , 2015
pJOE7361	IV für P <sub>mlA-comK-comS</sub> Integration in <i>B. subtilis</i> <i>his</i> -Operon	Amp, Spc	Rahmer <i>et al.</i> , 2015
pJOE7644	<i>aad9</i> , <i>bla</i> , $\Delta$ <i>manPA</i>	Amp, Spc	Altenbuchner, J.; n.v.
pJOE7710	IV für <i>yuaB</i> Deletion	Amp, Spc	Altenbuchner, J.; n.v.
pJOE8068	IV für <i>spo0B</i> -Deletion	Amp, Spc	Altenbuchner, J.; n.v.
pJOE8688	<i>mroxP'</i> - <i>bla</i> - <i>mroxP</i>	Cm, Spc	Altenbuchner, J., n.v.
pKAM160	P <sub>licB-lacZ</sub>	Spc	Heravi & Altenbuchner, 2014
pKAM180	P <sub>mlA-luc</sub>	Amp	Heravi, 2013
pMW168	<i>eGFP</i>	Spc	Wenzel <i>et al.</i> , 2011
pMW523	KV für Integration in <i>B. subtilis</i> <i>his</i> -Operon	Amp	Wenzel, 2013
pWAL275	<i>ori</i> <sup>+</sup> <sub>PUB110</sub> , <i>ori</i> <sub>pUC18</sub> , <i>rep</i> <sub>PUB110</sub> , <i>kan</i> , <i>bla</i> , <i>mrpS</i>	Amp, Km	Warth, L. & Altenbuchner, J. n.v.

**Tabelle 7: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide.** Erklärung: PCR: s... / ... (Template DNA); 3 Fragment Integration mit 2 PCR Produkten: s... / s... + s... / s... (Template DNA); *Overlap Extension*-PCR: s... / s... - s... / s... (Template DNA), Primer für Fusion der PCR-Produkte sind unterstrichen; Abk.: RE = verwendete Restriktionsenzyme, Amp = Ampicillin; Cm = Chloramphenicol; Km = Kanamycin Spc = Spectinomycin; HV = Hilfsvektor.

Name	PCR-Fragment + RE	Vektor + RE	Resistenz
pREG3 (P <sub>mlA-comS</sub> )	s8003/s8004 (Bs168) <u>AfIII</u> <u>NheI</u>	pKAM180 <u>AfIII</u> <u>NheI</u>	Amp
pREG4 (P <sub>mlA-dprA</sub> )	s8005/s8006 (Bs168) <u>AfIII</u> <u>NheI</u>	pKAM180 <u>AfIII</u> <u>NheI</u>	Amp
pREG5 (P <sub>mlA-dprA, comS</sub> )	s8005/s8006 (Bs168) <u>BsrGI</u>	pREG3 <u>BsrGI</u>	Amp
pREG6 (P <sub>mlA-comK</sub> )	s8007/s8008 (Bs168) <u>AfIII</u> <u>NheI</u>	pKAM180 <u>AfIII</u> <u>NheI</u>	Amp

Name	PCR-Fragment + RE	Vektor + RE	Resistenz
pREG7 ( <i>P<sub>mtlA</sub>-dprA,comK</i> )	s10576/s10577 (Bs168)	Gibson Assembly	pREG6 <i>NheI</i> Amp
pREG10 ( $\Delta$ <i>comQXPA</i> )	s8125/s8126 + s8127/s8128 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>BglI SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG12 ( $\Delta$ <i>srfAA-AD</i> )	s8172/s8173 + s8174/s8175 (Bs168)	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>	pJOE6743 <i>BamHI</i> Amp, Spc
pREG13 ( $\Delta$ <i>comK</i> )	s8132/s8130 + s8131/s8253 (Bs168)	<i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG14 ( $\Delta$ <i>maf</i> )	s8359/s8360 + s8355/s8356 (Bs168)	<i>NheI</i> <i>SacI</i>	pJOE6743 <i>NheI</i> Amp, Spc
pREG16	<i>yuaB</i>	<i>SphI</i>	pJOE7710 <i>SphI</i> Amp
pREG17	s8435/s8436 + s8437/s8438 (Bs168 – pMW168)	<i>KpnI</i>	pREG16 <i>KpnI</i> Amp
pREG18 ( <i>P<sub>comGA</sub>-eGFP::yuaB</i> )	pREG17	<i>SphI</i>	pJOE7710 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG21 ( $\Delta$ <i>abrB</i> )	s8600/s8601 + s8602/s8603 (Bs168)	<i>HindIII</i> <i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>	pJOE6743 <i>HindIII</i> Amp, Spc
pREG22 ( $\Delta$ <i>sinR</i> )	s8606/s8607 + s8608/s8609 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EcoRI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG25 ( $\Delta$ <i>recJ</i> )	s8685/s8686 + s8897/s8898 (Bs168)	<i>HindIII</i> <i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>	pJOE6743 <i>HindIII</i> Amp, Spc
pREG28 ( $\Delta$ <i>dprA</i> )	s8695/s8696 + s8697/s8698 (Bs168)	<i>HindIII</i> <i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>	pJOE6743 <i>HindIII</i> Amp, Spc
pREG29 (HV für REG45)	s8785/s8786 + s8787/s8788 (Bs168)	<i>EagI</i>	pJOE6743 <i>BamHI</i> Amp, Spc
pREG31 ( <i>recA</i> , HV für pREG46)	s8791/s8792 (Bs168)	<i>BamHI</i>	pJOE4786 <i>BamHI</i> Amp
pREG33 ( $\Delta$ <i>sinI</i> )	s8610/s8611 + s8612/s8613 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EcoRI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG36 (HV für pREG36 )	s8856/s8857 (pJOE7361)	<i>AflIII</i> <i>EcoRV</i>	pKAM160 <i>AflIII</i> <i>EcoRV</i> Spc
pREG37 ( <i>P<sub>licB</sub>-comK-comS</i> )	pREG36	<i>NheI</i>	pHM31 <i>NheI</i> Amp
pREG38 ( $\Delta$ <i>rok</i> )	s8809/s8810 + s8811/s8812 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EcoRI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG43 ( $\Delta$ <i>kinC</i> )	s9058/s9059 + s9060/s9061 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EcoRI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG45 ( $\Delta$ <i>mecA::cat</i> )	s9092/s9093 (pJOE8688)	<i>EagI</i>	pREG29 <i>EagI</i> Amp, Spc, Cm
pREG46 (HV für pREG47)	s9092/s9093 (pMW943)	<i>EagI</i>	pREG31 <i>EagI</i> Amp
pREG47 ( $\Delta$ <i>recA::cat</i> )	pREG46	<i>BamHI</i>	pJOE6743 <i>BamHI</i> Amp, Spc, Cm

Name	PCR-Fragment + RE	Vektor + RE	Resistenz
pREG49 ( <i>comGA</i> , <i>comGB</i> )	s9193/s9194 + s9197/s9198 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EagI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG50 ( <i>comGA-eGFP-</i> <i>comGB</i> )	s9195/s9196 (pMW168)	<i>EagI</i>	pREG49 <i>EagI</i> Amp, Spc
pREG51 ( <i>aad9</i> : 70 A-T: Stopp)	s9216/s9217 + s9218/s9219 (pJOE6743)	<i>EagI</i>	pWAL275 <i>EagI</i> Amp, Km
pREG52 ( <i>aad9</i> : 550 A-T: Stopp)	s9216/s9220 + s9221/s9219 (pJOE6743)	<i>EagI</i>	pWAL275 <i>EagI</i> Amp, Km
pREG54 ( $\Delta$ <i>rapH/phrH</i> )	s9222/s9223 + s9224/s9225 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EagI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG56 ( $\Delta$ <i>rapC/phrC</i> )	s9226/s9227 + s9228/s9229 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EagI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG58 ( $\Delta$ <i>degU</i> )	s9314/s9315 + s9316/s9317 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EcoRI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG62 ( $\Delta$ <i>kinB</i> )	s9322/s9323 + s9324/s9325 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EcoRI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG70 ( $\Delta$ <i>rapG/phrG</i> )	s9347/s9348 + s9349/s9350 (Bs168)	<i>BamHI</i> <i>EagI</i> <i>BamHI</i>	pJOE6743 <i>BamHI</i> Amp, Spc
pREG72 ( $\Delta$ <i>ftsH</i> )	s9351/s9352 + s9353/s9354 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EcoRI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG74 ( $\Delta$ <i>slrR</i> )	s9626/s9627 + s9666/s9625 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EcoRI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc
pREG80 (HV für pREG84)	s10101/s10102 + s10103/s10104 (Bs168)	<i>SphI</i> <i>EagI</i> <i>SphI</i>	pJOE4786 <i>SphI</i> Amp
pREG84 ( $P_{comK-comK}::P_{licB-}$ <i>comK-comS</i> )	s10105, s10107 (pREG37) + pREG80	<i>SphI</i> <i>EagI</i> <i>SphI</i>	pJOE6743 <i>SphI</i> Amp, Spc

### 2.1.3 Gibson Assembly<sup>®</sup> Produkte

**Tabelle 8: Tabelle mit den in dieser Arbeit entstandenen Gibson Assembly<sup>®</sup> Produkten.** Erklärung: Ligation der 3 Fragmente mittels überlappender Sequenzen. s.../s... (Template DNA); Abk.: *cat* = Chloramphenicol Resistenzgen.

Name	Beschreibung	Oligonukleotide
Gibson1	<i>dprA</i>	s10222/s10223
Gibson2	<i>kre'-cat-'kre</i>	s10633/s10634 (Bs168) + s10635/s10636 (pJOE8688) + s10637/s10638 (Bs168)
Gibson3	<i>sigB'-cat-'sigB</i>	s10639/s10640 (Bs168) + s10641/s10642 (pJOE8688) + s10643/s10644 (Bs168)

Name	Beschreibung	Oligonukleotide
Gibson4	<i>sigD'</i> - <i>cat'</i> - <i>sigD</i>	s10645/s10646 (Bs168) + s10647/s10648 (pJOE8688) + s10649/s10650 (Bs168)
Gibson5	<i>rapA'</i> - <i>cat'</i> - <i>phrA</i>	s10684/s10685 (Bs168) + s10686/s10687 (pJOE8688) + s10688/s10689 (Bs168)

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden bei Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH und & Co.KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen), Life Technologies GmbH (Darmstadt) und VWR International GmbH (Darmstadt) bezogen.

### 2.2.2 Enzyme

**Tabelle 9: Verwendete Enzyme mit Hersteller und Verwendungszweck.**

Enzym	Hersteller	Zweck
Alkalische Phosphatase	Roche Applied Science	Abspaltung freier Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA
Klenow Enzym	Roche Applied Science	Klonierung; mit dNTPs Auffüllreaktion in 5'-3'-Richtung
Restriktions- endonukleasen	New England Biolabs, Roche Applied Science, Thermo Scientific	Klonierung; Restriktionsenzym-analyse
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Roche Applied Science	Verknüpfung kompatibler DNA Enden
High-Fidelity PCR Enzym Mix	Thermo Scientific	PCR
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Scientific	Kolonie-PCR
Phusion® Hot Start DNA-Polymerase	Thermo Scientific	PCR
Q5™ High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs	PCR

### 2.2.3 Oligonukleotide

Die in Tabelle 10 aufgeführten Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit verwendet und von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) erworben.

**Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.** Abk.: FP: *forward* Primer; RP: *reverse* Primer; P: Promotor; GA: Gibson Assembly (klein geschriebene Basen entsprechen der überlappenden Sequenz).

Name	Sequenz (5'→3' Richtung)	Verwendungszweck
s6851	CTAGCTTTTTATTTTTAAAAAAT	FP Integration $P_{mlA}$
s6852	GCTATGTGACATCTCAGGT	FP Integration <i>comK</i>
s6853	CCTCCATCCTTTTTCTGCACTTAAGAAA- TATGTTTCAGAGAA	RP Integration $P_{mlA}$
s6854	TTCTCTGAACATATTTCTTAAGTG- CAGAAAAAGGATGGAGG	RP Integration <i>comK</i>
s7328	GGGATAAAGAATTGGATTATC	FP $\Delta spo0A$ - <i>spoeIVB</i> upstream
s7329	CATGAGCTTATTAAGTGGTC	RP $\Delta spo0A$ - <i>spoeIVB</i> upstream
s7330	GACCACTTAATAAGCTCATGACTGATGAACGAATG- GATGT	FP $\Delta spo0A$ - <i>spoeIVB</i> downstream
s7331	GAGATTGACCAAATTGAAAAC	RP $\Delta spo0A$ - <i>spoeIVB</i> downstream
s7707	CCTATTTTTCTAATACCGTTC	RP $P_{mlA}$ - <i>comK</i>
s7708	GAACGGTATTAGAAAAATAGGTGTATTTG- GAAGAGAACGAAA	FP <i>comS</i>
s7709	GGAGGATTTTCGTGCCGG	RP <i>comS</i>
s8003	AAAAACTTAAGCGAAAGCAAGGAGGAGCAGACGTT- TGAACCGATCAGGCAAGCA	FP <i>comS</i>
s8004	AAAAAGCTAGCTGTACACTACTTCTCCCTCCAGCAG	RP <i>comS</i>
s8005	AAAAACTTAAGTGTACACAAAAGGAGGTCA- ATCTATTGGATCAGGCCGCTGTCT	FP <i>dprA</i>
s8006	AAAAAGCTAGCTCAGGAAGTTCCTCGAAAATAT	RP <i>dprA</i>
s8007	AAAAACTTAAG AAGGATGGAGGCCATAATATG	FP <i>comK</i>
s8008	AAAAAGCTAGCCTAATACCGTTCCCCGAGC	RP <i>comK</i>
s8125	AAAAAGCATGCATGCTGCTTCTAAAGGCTCAA	FP $\Delta comQXPA$ upstream
s8126	AAAAAGAATTCATGTTGGGGGGTGTAGAGAT	RP $\Delta comQXPA$ upstream
s8127	AAAAAGAATTC TTTCTCCTTGATCCGGACAG	FP $\Delta comQXPA$ downstream
s8128	AAAAAGCATGCAGGCCACAACCTTAGCGTTG	RP $\Delta comQXPA$ downstream
s8130	AAAAAGAATTC TAAAGCTATGCCGTCGGAATT	RP $\Delta comK$ upstream
s8131	AAAAAGAATTC TATGGCCTCCATCCTTTTTTC	FP $\Delta comK$ downstream
s8132	AAAAAGCATGCAATGGCGGAACAATTGTGAAC	FP $\Delta comK$ upstream
s8172	AAAAAGGATCCGTTGAATATTCTCTGACCCC	FP $\Delta srfAA$ - <i>AD</i> upstream
s8173	AAAAAGAATTCATTGTCATACCTCCCCTAATC	RP $\Delta srfAA$ - <i>AD</i> upstream
s8174	AAAAAGAATTCATGAAGTGATGAAAGGAGGAG	FP $\Delta srfAA$ - <i>AD</i> down- stream
s8175	AAAAAGGATCCTTCCGTTTGTGACAGCAGGA	RP $\Delta srfAA$ - <i>AD</i> down- stream



Name	Sequenz (5'→3' Richtung)	Verwendungszweck
s8253	AAAAAGCATGCTCAGGTAAACTAACGGGTCG	RP $\Delta comK$ downstream
s8355	AAAAAAGTACTTGACGGTTCTATAAACGGGAA	FP $\Delta maf$ downstream
s8356	AAAAAGCTAGCAAACCTCACAATTTTTTATCCCC	RP $\Delta maf$ downstream
s8359	GGGGGGCTAGCAAAAACAAGCGGCACAAAC	FP $\Delta maf$ upstream
s8360	GGGGGAGTACTCATGTTTCGTCATCCTTTCAGG	RP $\Delta maf$ upstream
s8435	CCCCCGGTACCTTATTTATAGGGAAAATTATAATGAC	FP $P_{comGA}$
s8436	TGTCTGCCATTTTGATTCCCTCTCCTTTC AAC	RP $P_{comGA}$
s8437	AGGGAATCAAATGGCAGACAATAACAAAGGAT	FP $eGFP$
s8438	CCCCCGGTACCCAGTGCCAAGCTTGTTTAAA	RP $eGFP$
s8600	CCCCCAGTGGATGCGATTGCTGC	FP $\Delta abrB$ upstream
s8601	CCCCGAATTCTCATTCTTGTACAAAAACGTTC	RP $\Delta abrB$ upstream
s8602	CCCCGAATTCTCTCCTCCCAAGAGATACTTA	FP $\Delta abrB$ downstream
s8603	CCCCCTTCATACTCATCAAGATAGATGT	RP $\Delta abrB$ downstream
s8606	CCCCCGCATGCATGCAGGAGCCGTCCGAC	FP $\Delta sinR$ upstream
s8607	CCCCGAATTCTGTCATCACCTTCTTGTGAT	RP $\Delta sinR$ upstream
s8608	CCCCGAATTCTGCCTGAGCAGAGGCACTA	FP $\Delta sinR$ downstream
s8609	CCCCCGCATGCAACGGCGGCAGCAATACATC	RP $\Delta sinR$ downstream
s8610	CCCCCGCATGCGCCTTGGCTTGGTATAAATGT	FP $\Delta sinI$ upstream
s8611	CCCCGAATTCGCAGTTTCTCCTCCTAAAATAC	RP $\Delta sinI$ upstream
s8612	CCCCGAATTCATGTGCTATAATATCACAAGGAA	FP $\Delta sinI$ downstream
s8613	CCCCCGCATGCATATCAAGGCAACTCCATTAAG	RP $\Delta sinI$ downstream
s8649	AAAAAAGGATCCGGCCTTCTAAGCCTGACA	FP $\Delta spo0B$ upstream
s8650	TAGCGGAGTTTTTAACGGTTT	RP $\Delta spo0B$ upstream
s8651	AAACCGTTAAAAACTCCGCTACATTTT- CGCACTCCCAATC	FP $\Delta spo0B$ downstream
s8652	AAAAAAGGATCCTGGACAAGATCTTGTTTGTG	RP $\Delta spo0B$ downstream
s8685	CCCCCGCATGCCAGTCAATACTTGTTCGTTTCG	FP $\Delta recJ$ upstream
s8686	AAAAAGAATTCAGAGGCTTATGAAAGTACGAG	RP $\Delta recJ$ upstream
s8687	CCCCGAATTCAAATTCACCCCTCAACCACC	FP $\Delta recJ$ downstream
s8688	AAAAAGCATGCAGAGTGGTGTAAAGCAGAGG	RP $\Delta recJ$ downstream
s8695	GGGGGAAGCTTGAGCTTGATCTCGTGATTTGT	FP $\Delta dprA$ upstream
s8696	CCCCGAATTCTAGATTGACCTCCTTTTGTTAG	RP $\Delta dprA$ upstream
s8697	CCCCGAATTCTTCAATATACGGAACCCTTTTG	FP $\Delta dprA$ downstream
s8698	CCCCAAGCTTCTGTGCATCCACTAAATCCAT	RP $\Delta dprA$ downstream
s8785	CCCCCGGATCCATTTTATTTCTTTTGTGACTG	FP $\Delta mecA$ upstream
s8786	CCCCCGGCCGTCCTCAGATGCTGGTTCTT	RP $\Delta mecA$ upstream
s8787	GGGGGCGGCCGTCCTTGACGCCTTGCTGGATG	FP $\Delta mecA$ downstream
s8788	GGGGGGGATCCTCAACTCCTGTTTCGCTGTAT	RP $\Delta mecA$ downstream
s8791	CCCCCGGATCCATGAGTGATCGTCAGGCAG	FP $\Delta recA$
s8792	CCCCCGGATCCTTATTTCTTCAAATTCGAGTTCTT	RP $\Delta recA$
s8809	CCCCCGCATGCCCCCGTCCGAAGATGATC	FP $\Delta rok$ upstream

Name	Sequenz (5'→3' Richtung)	Verwendungszweck
s8810	CCCCCGAATTCCATTCCTCAATGTACCCCCT	RP $\Delta$ rok upstream
s8811	CCCCCGAATTCTGCAGAATCAGCAAACGAATAA	FP $\Delta$ rok downstream
s8812	CCCCCGCATGCATAAACTTCATATTGCGAAAGTC	RP $\Delta$ rok downstream
s8856	GGGGGGATATCGTGAAAAAAGTAATAGGTATTTAG	FP <i>comK-comS</i>
s8857	GGGGGCTTAAGCAGAAAAAGGATGGAGGCCA	RP <i>comK-comS</i>
s9058	CCCCCGCATGCTACTGCGATTTTTGGGGGTG	FP $\Delta$ kinC downstream
s9059	CCCCCGAATTCCATATGACCACCTGCCGCT	RP $\Delta$ kinC downstream
s9060	AAAAAGAATTCTGAGAGGAGAAAAATAAAGTGAA	FP $\Delta$ kinC upstream
s9061	CCCCCGCATGCTGCCTTCCGCCAGCTTCAA	RP $\Delta$ kinC upstream
s9092	CCCCCGGCCGCGTACCTATTAATGTATCGTTTT	FP <i>cat</i>
s9093	CCCCCGGCCGCCATAGTGAAGTGGCGATGC	RP <i>cat</i>
s9193	CCCCCGCATGCTATTTCCGAAGACAGGAGCC	FP <i>comGA</i>
s9194	CCCCCGGCCGATCTTTTTTCATGATAAACCCACC	RP <i>comGA</i> ohne Stopp-Codon
s9195	GGGGGCGGCCGGGAGGTGGAG-TAGCAGACAATAACAAAGGATCC	FP <i>eGFP</i> Linker zu <i>comGA</i>
s9196	GGGGGCGGCCGTTACTTGTACAGCTCGTCCAT	RP <i>eGFP</i>
s9197	GGGGGCGGCCGAAAAGTCTGGTTGTTAAAGGATC	FP <i>comGB</i>
s9198	GGGGGGCATGCGGCTGTCATAAATTGAGAGGC	RP <i>comGB</i>
s9216	CCCCCGGCCGACCCCTGGCGAATGGCGA	FP <i>aad9</i> -Fusion
s9217	TCAACTCCTGATCCAAACATCTAAGTACCAATAAGGT-TATTTTTTA	RP <i>aad9</i> -Stoppcodon Anfang
s9218	AAAAATAACCTTATTGGTACTTAGATGTTTGGATCAG-GAGTTGAG	FP <i>aad9</i> -Stoppcodon Anfang
s9219	CCCCCGGCCGAATTGAAAAAAGTGTTCACCA	FP <i>aad9</i> -Stoppcodon Ende
s9220	TGTCCATAGTTAAAAATCATACGTCATAAAGTTAATA-TAGAGTTGGTT	RP <i>aad9</i> -Stoppcodon Ende
s9221	ACCAACTCTATATTAACCTTATGACGTATGATTT-TAACTATGGACA	RP <i>aad9</i> -Fusion
s9222	TTTTTGCATGCCCTTACCTTGCCTCCGC	FP $\Delta$ rapH/ <i>phrH</i> upstream
s9223	TTTTTCGGCCGCGGCTTCCCTCCTTCTCTA	RP $\Delta$ rapH/ <i>phrH</i> upstream
s9224	CCCCCGGCCGCTTTACGGAAGACGTTCCATT	FP $\Delta$ rapH/ <i>phrH</i> downstream
s9225	CCCCCGCATGCCGCATGGAATTGATCAGGCT	RP $\Delta$ rapH/ <i>phrH</i> downstream
s9226	CCCCCGCATGCTCAGATCCCAGCAAATTACCT	FP $\Delta$ rapC/ <i>phrC</i> upstream
s9227	CCCCCGGCCGCTTACCCCTCTCCCATCA	RP $\Delta$ rapC/ <i>phrC</i> upstream
s9228	CCCCCGGCCGAAAAAACACCGCAAGACATAG	FP $\Delta$ rapC/ <i>phrC</i> downstream
s9229	CCCCCGCATGCGTACAACGGCAAGAGCCGC	RP $\Delta$ rapC/ <i>phrC</i> downstream
s9314	AAAAAGCATGCCGACCCGCTCAAATGCT	FP $\Delta$ degU upstream
s9315	AAAAAGAATTTCGTCACAAGCCACGCCTCC	RP $\Delta$ degU upstream
s9316	CCCCCGAATTCATGAGATAGTATAATAGGAGACT	FP $\Delta$ degU downstream
s9317	CCCCCGCATGCCTCAAAGGCACAATTACCTTA	RP $\Delta$ degU downstream

Name	Sequenz (5'→3' Richtung)	Verwendungszweck
s9322	GGGGGGCATGCGGCTTCAGCGATCATTATTC	FP $\Delta kinB$ downstream
s9323	GGGGGGAATTCAAAACACTTGGTAAAGAAGAATA	RP $\Delta kinB$ downstream
s9324	AAAAAGAATTCACAGCAGCTTCCAAAAAGGC	FP $\Delta kinB$ upstream
s9325	AAAAAGCATGCGCTGCCGAAGAGTATGGAG	RP $\Delta kinB$ upstream
s9347	AAAAAGGATCCCCTCACCCACATTATATTAGG	FP $\Delta rapG$ upstream
s9348	AAAAACGGCCGACTCCTTTCTCTAGTGACTTAT	RP $\Delta rapG$ upstream
s9349	AAAAACGGCCGCGCTGAGAAAATGATTGGATAA	FP $\Delta rapG$ downstream
s9350	AAAAAGGATCCGCCTAGGCATTGGCCACG	RP $\Delta rapG$ downstream
s9351	CCCCCGCATGCAAGATCTTGTGATTCCAAACAG	FP $\Delta ftsH$ downstream
s9352	CCCCCGAATTCCCTTACCTCCTCCCACAGT	RP $\Delta ftsH$ downstream
s9353	CCCCCGAATTCTTTTTTATGTAAATGATTGGCTCA	FP $\Delta ftsH$ upstream
s9354	TTTTTGATGCGTTTGTTCATCAATATAGCAG	RP $\Delta ftsH$ upstream
s9625	CCCCCGAATTCTTCTCCTCTATTCCTGTCGTT	RP $\Delta slrR$ upstream
s9626	CCCCCGAATTCAATCGGCTTGTCTGTCCATG	FP $\Delta slrR$ downstream
s9627	CCCCCGCATGCCTTCCATGATTGCTTTCTGG	RP $\Delta slrR$ downstream
s9666	CCCCCGCATGCATGACAGCAGCGCCA	FP $\Delta slrR$ upstream
s9667	CTTCACCCATAAACACAGTAC	FP <i>trpC</i>
s9668	TTGACGGGAATATCGACTCT	RP <i>trpC</i>
s10101	AAAGCATGCAACAAAGGCAGTGC	FP $P_{comK-comK}$ upstream
s10102	AAACGGCCGAAAGAGAAAAAATCGTACTG	RP $P_{comK-comK}$ upstream
s10103	AAAAACGGCCGAAAAATAGGAAGGAGCTGAC	FP $P_{comK-comK}$ downstream
s10104	AAAAAGCATGCGCCGAGGAACAGC	RP $P_{comK-comK}$ downstream
s10105	TTTCGGCCGGGTATTTAGATTTATATTGGGTGC	FP $P_{licB}$
s10106	TTTCGGCCGCCTTGCTTTCGTTCTCT	RP $P_{licB}$
s10446	ATGTTTGCAAACGATTCAAAC	FP $\Delta amyE$ downstream (GA)
s10447	attaaaaaattataaAATTGACTGCCGTAACCTG	RP $\Delta amyE$ downstream (GA)
s10448	gcagcaattTTATAATTTTTTAACTGTTATT- TAAATAGTTTATAGTTAAATTTAC	FP <i>aad9</i> (GA)
s10449	caattttgtGGCGAATGGCGATTTTCG	RP <i>aad9</i> (GA)
s10450	gccattgccAACAAAATTGCCTGATGGC	FP $\Delta amyE$ upstream (GA)
s10451	ATGGGGAAGAGAACCGCT	RP $\Delta amyE$ upstream (GA)
s10452	ttgcaaacatATGGGGAAGAGAACCGCT	FP $\Delta amyE$ downstream (GA) mit Überhang
s10453	tcttcccatATGTTTGCAAACGATTCAAAC	RP $\Delta amyE$ upstream (GA) mit Überhang
s10576	ggggaacggtattaggAAAAGGAGGTCAATCTATTGG	FP <i>dprA</i> für $P_{mlA-comK-}$ <i>dprA</i>
s10577	tttagatttatattgggtgAAAGGGTTCGTATATTGAAC	RP <i>dprA</i> für $P_{mlA-comK-}$ <i>dprA</i>
s10633	ccattcctgCTGGCAGGAAGCGTAATCG	FP $\Delta kre$ (GA) upstream
s10634	taaccaactgTTAGGGTTGGGGGCGGTT	RP $\Delta kre$ (GA) upstream

Name	Sequenz (5'→3' Richtung)	Verwendungszweck
s10635	ccaaccctaaCAGTTGGTTATTTCTTTAGCAC	FP <i>cat</i> (GA)
s10636	gcaatagtgGATTTAAATAACTATAGGGTACAGATC	RP <i>cat</i> (GA)
s10637	ttatntaaatCACCTATTGCAAGAATATGTCCGG	FP $\Delta$ <i>kre</i> (GA) downstream
s10638	ttcctgccagCAAGGAATGGAGCGGCAC	RP $\Delta$ <i>kre</i> (GA) downstream
s10639	agctggacatTACCGGATTGGGCGTTTTTG	FP $\Delta$ <i>sigB</i> (GA) upstream
s10640	taaccaactgCTGCGCTTGTCATCTTG	RP $\Delta$ <i>sigB</i> (GA) upstream
s10641	acaagcgcagCAGTTGGTTATTTCTTTAGCAC	FP <i>cat</i> (GA)
s10642	caagcgcgagGATTTAAATAACTATAGGGTACAGATC	RP <i>cat</i> (GA)
s10643	ttatntaaatCTCGCGCTTGCAACGCAA	FP $\Delta$ <i>sigB</i> (GA) downstream
s10644	caatccgtaATGTCCAGCTTCTTTTTCTGGTTTTTTAG	RP $\Delta$ <i>sigB</i> (GA) downstream
s10645	ggaggaaaaGCCATTGTTGTCGACACG	FP $\Delta$ <i>sigD</i> (GA) upstream
s10646	taaccaactgTCCACTCTTTCCAGCGCG	RP $\Delta$ <i>sigD</i> (GA) upstream
s10647	aaagagtgaCAGTTGGTTATTTCTTTAGCAC	FP <i>cat</i> (GA)
s10648	aatgccttgGATTTAAATAACTATAGGGTACAGATC	RP <i>cat</i> (GA)
s10649	ttatntaaatCAAAGGCATTATTTAAATTAAGAATCTG	FP $\Delta$ <i>sigD</i> (GA) downstream
s10650	cgacaacaatggcTTTTTCCTCCGCTTAGGTC	RP $\Delta$ <i>sigD</i> (GA) downstream
s10680	TGTGATTCCGCCGCAA	FP <i>trpC</i>
s10681	AAAGCAGCAGTTCCGC	RP <i>trpC</i>
s10682	TTTTTCAATTCCGCTGGCAAG	FP <i>trpC</i>
s10683	TCTAAAAGCGGAAGCGCTG	RP <i>trpC</i>
s10684	ttaaccgaaaCTTTCAGGCAGCGAGACG	FP $\Delta$ <i>rapA/phrA</i> (GA) upstream
s10685	cctatagtaGAACTGCCGGATATGAGTATAC	RP $\Delta$ <i>rapA/phrA</i> (GA) upstream
s10686	ccggcagttcTAACTATAGGGTACAGATCTGATATC	FP <i>cat</i> (GA)
s10687	atgaaccatcTCTTTAGCACAGTATGAAACG	RP <i>cat</i> (GA)
s10688	gtgctaagaGATGGTTCATGCAGGTGAAAC	FP $\Delta$ <i>rapA/phrA</i> (GA) downstream
s10689	tgctgaaagTTTCGGTTAAGCGGCAGAC	RP $\Delta$ <i>rapA/phrA</i> (GA) downstream

## 2.2.4 Kits

**Tabelle 11: Verwendete Kits.**

Name	Hersteller	Zweck
innuPrep Plasmid Mini Kit	Analytic Jena	Plasmidisolierung
NucleoBond® Ytra Midi	Macherey-Nagel	Plasmidisolierung
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Produkten
DNeasy® Blood & Tissue Kit	QIAGEN	Isolierung chromosomaler DNA

## 2.2.5 Konfokalmikroskopie

**Tabelle 12: Verwendete Materialien für die Konfokalmikroskopie.**

Name	Hersteller	Zweck
FM® 4-64 Dye	Molecular Probes™	Membranfärbung
Hank's Balanced Salt Solution, Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> free (HBSS)	Invitrogen	Membranfärbung
DAPI	Sigma-Aldrich	Nukleinsäurefärbung

## 2.2.6 Medien

**Tabelle 13: Verwendete Medien zur Kultivierung, Stammhaltung und Transformation.** Für die Herstellung von LB-Agar-Nährböden wurden 15g l<sup>-1</sup> Euroagar (Becton Dickinson GmbH) zugegeben. Die Medien wurden 30 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert.

Medium	Zusammensetzung	Menge
<b>LB-Medium (pH 7,2)</b> (Bertani, 1951)	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 1,0 l
<b>dYT</b> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Trypton	16,0 g
	Hefeextrakt	10,0 g
	NaCl	5,0 g
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 1,0 l
<b>TY-Medium (pH 7,2)</b>	Trypton	5,0 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 0,5 l
<b>Glycerinkulturmedium</b>	87 % Glycerin*	57,5 ml
	TY-Medium*	42,5 ml
<b><u>Transformationsmedien für <i>B. subtilis</i></u></b>		
<b>Spizizen Minimalmedium (MG)</b> (Spizizen, 1958)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,0 g
	Na <sub>3</sub> Citrat x 2H <sub>2</sub> O	1,0 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	D-Glucose*	5,0
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 1,0 l
<b>Medium I</b>	MG	9,25 ml
	Casaminoacids (1 % w/v)*	0,2 ml
	L-Tryptophan (0,5 % w/v)*	0,5 ml
	SEL	5 µl

Medium	Zusammensetzung	Menge
<b>Medium II</b>	MG	8,0 ml
	Casaminoacids (1 % w/v)*	0,1 ml
	MgSO <sub>4</sub> (1 M)*	0,05 ml
	L-Tryptophan (0,5 % w/v)*	0,1 ml
<b><u>Transformationsmedien für <i>E. coli</i></u></b>		
<b>Transformation and Storage Solution (TSS-Medium)</b> (Chung <i>et al.</i> , 1989)	LB-Medium (pH 6,5)	82,5 ml
	PEG 6000	10,0 g
	DMSO	5,0 ml
	MgCl <sub>2</sub> (2 M)	2,5 ml

\* separat autoklaviert

## 2.2.7 Antibiotika und Medienzusätze

**Tabelle 14: Verwendete Antibiotika und Medienzusätze.**

Antibiotikum / Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg ml <sup>-1</sup> in 50 % (w/v) Ethanol	100 µg ml <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	25 mg ml <sup>-1</sup> in Ethanol	5 µg ml <sup>-1</sup>
Erythromycin	10 mg ml <sup>-1</sup> in 50 % Ethanol	5 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin	50 mg ml <sup>-1</sup> in 0,1 M NaOH	5 µg ml <sup>-1</sup>
Spectinomycin	100 mg ml <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	100 µg ml <sup>-1</sup>
IPTG	100 mM in 50 % EtOH	250 µM
X-Gal	156 mM in Dimethylformamid	195 µM
Casaminoacids	1 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	0,02 % (w/v)
D(+)-Glucose	20 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	0,5 % (w/v)
D-Mannitol	20 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	0,5 % (w/v)
D(+)-Mannose	20 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	0,5 % (w/v)
D(+)-Cellibiose	20 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	0,5 % (w/v)
D-Glutamat	20 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	0,5 % (w/v)

## 2.2.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 15: Puffer und Lösungen für Biofeedback-Plasmidisolierung.

Puffer / Lösung	Komponenten	Zusammensetzung
Resuspendierungspuffer	D-Glucose	9,9 g
	TRIS / HCL (1 M, pH8,0)	25,0 ml
	EDTA	3,72 g
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 1,0 l
Lysepuffer	NaOH (2M)	0,84 ml
	SDS (10% w/v)	0,84 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	6,72ml
Neutralisierungslösung	NH <sub>4</sub> -Acetat	578,1 g l <sup>-1</sup>

Tabelle 16: Sonstige Puffer und Lösungen.

Puffer / Lösung	Komponenten	Zusammensetzung
50x TAE	TRIS	242,0 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA	18,6 g
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 1,0 l
TE 10.01	TRIS / HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	0,1 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 1,0 l
10x DNA-Auftragspuffer für Agarosegelelektrophorese	Xylencyanol	0,5 g
	Bromphenolblau	0,5 g
	Glycerin (86 % v/w)	116,3 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	ad 200,0 ml
Lysepuffer zur Isolierung chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	TRIS (1M, pH 8,0)	2,5 ml
	EDTA (0,5M)	5 ml
	Saccharose (20% w/v)	50 ml
	Glycin (0,5 M)	0,1 ml
	Lysozym	20,0 mg ml <sup>-1</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 100 ml
10x PBS	NaCl	80,0 g
	KCl	2,0 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
	H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 1,0 l

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung

Sowohl die *E. coli* als auch die *B. subtilis* Stämme wurden entweder als Flüssig- oder als Plattenkultur bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Im Falle von antibiotika-resistenten Zellen wurde das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (siehe Tabelle 14). Plattenkulturen auf LB-Agarböden wurden mittels eines Ver-einzelungsausstrichs hergestellt, über Nacht kultiviert und anschließend bei 8 °C für maximal vier Wochen gelagert. Übernachtkulturen (ÜK) wurden mit einer Einzelkolonie in 5 ml Kulturmedium beimpft und für ca. 16 h bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die Kultivierung der Tagkulturen (TK) erfolgte in Erlenmeyerkolben auf dem Schüttler bei 150 rpm, wobei das Kulturvolumen 1/10 des Volumens des Kolbens be-trug. Für *B. subtilis* wurden Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen und für *E. coli* ohne Schikane verwendet. Die Herstellung von Glycerinkulturen zur dauerhaften Lagerung erfolgte, indem eine ÜK angezogen und anschließend abzentrifugiert (Heraeus Mega-fuge, 4.500 rpm, 5 min, RT) und der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet wurde in 3 ml TY-Glycerin resuspendiert und die Zellsuspension auf zwei 2 ml-Gefrier-röhrchen verteilt und bei -70 °C gelagert.

### 2.3.2 Bestimmung der Zellmasse

Die indirekte Bestimmung der Zellmasse in einer Bakteriensuspension erfolgte über die Ermittlung der optischen Dichte (OD) im GENESYS 10 Vis Spektrophotometer (Ther-mo Fisher Scientific, Ulm) bei 600 nm. Die Eichung erfolgt gegen Luft und als Refe-renzwert diente unbeimpftes Medium. Die  $OD_{600}$  berechneten sich aus der Differenz des Probenmesswertes und dem Wert des Referenzwertes. Proben ab einer  $OD_{600} \sim 0,5$  wurden im Verhältnis 1:10 mit dem verwendeten Medium verdünnt, um den linearen Messbereich des Photometers nicht zu verlassen.



### 2.3.3 Transformation

#### 2.3.3.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der TSS-Hitzeschock-Methode (Chung *et al.*, 1989) und eine Tageskultur diente für 5 Transformationsansätze. Dafür wurden die *E. coli* Stämme JM109 bzw. NM538 in 5 ml LB<sub>0</sub>-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und für 135 min bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub>~0,4 inkubiert (Schüttler, 150 rpm). Die gesamte Kultur wurde in ein 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss (Greiner Bio-one, Frickenhausen) überführt, pelletiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 10 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml eisgekühltem TSS-Medium (*Transformation and Storage Solution*; siehe Tabelle 13) resuspendiert, davon je 200 µl der TSS-Zellsuspension mit 10 µl Ligationsansatz oder 1 µl bis 5 µl Plasmid-DNA gemischt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Für die Negativ-Kontrolle wurde keine DNA hinzu gegeben. Der Hitzeschock erfolgte anschließend bei 42 °C für 90 s. Durch diese Inkubation entstehen kurzfristig Poren in der Zellmembran, wodurch eine DNA-Aufnahme ermöglicht wird. Die transformierten Zellen wurden sofort nach dem Hitzeschock auf Eis abgekühlt und anschließend in Reagenzgläser mit 2 ml LB<sub>0</sub>-Medium pipettiert. Nach 55 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 5 min, 4.500 rpm, RT), das Zellpellet in ca. 100 µl Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Agar Nährböden mit entsprechendem Medium ausplattiert. Im Falle der Plasmid-DNA wurden 100 µl aus der Kultur direkt ausplattiert.

#### 2.3.3.2 Transformation von *B. subtilis* nach Anagnostopoulos und Spizizen (Paris Methode)

Die Transformation von *B. subtilis* wurde mit der Methode von Anagnostopoulos und Spizizen (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961) durchgeführt. Dafür wurde die ÜN mit 5 ml Medium I angeimpft und für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Im ersten Schritt wurde die TK mit einer Zellmenge, entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 0,1 aus der ÜN in Medium I angeimpft und anschließend für 5 bis 6 h bis zum Ende der exponentiellen Phase bei 37°C (Schüttler, 150 rpm) inkubiert. Im zweiten Schritt wurde die Kultur in frisches Medium II im Verhältnis 1:10 überführt und für weitere 90 min bei 37°C (Schüttler,

150 rpm) inkubiert. Das Medium II unterscheidet sich zu Medium I in einer geringeren Aminosäuremenge. Anschließend wurde 1 ml dieser Kultur in ein Röhrchen überführt und mit DNA versetzt. Im Falle von pWAL275 wurden 100 ng Plasmid-DNA in Dimerkonformation oder 200 ng Plasmid-DNA in Monomerkonformation verwendet. Bei chromosomaler DNA wurden 3000 ng eingesetzt sowie 600 ng im Falle von PCR-Produkten. Anschließend wurde die Kultur für weitere 60 min bei 37 °C inkubiert und auf Platten mit geeignetem Selektivmedium ausplattiert. Im Falle einer Transformation mit Plasmid-DNA wurde das Pellet ausplattiert. Die Plasmid-DNA wurde i.d.R. aus dem Bakterium *E. coli* NM538 isoliert (ausgenommen pWAL275), da dieser Stamm Plasmid-Multimere produziert und dies zu einer höheren Transformationsrate führt. In manchen Fällen wurde eine Steigerung der Transformationsrate durch Schneiden an einer Restriktionsstelle und Ligieren des Plasmids erzeugt.

### 2.3.3.3 Transformation von *B. subtilis* in LB-Medium

Um *B. subtilis* mit dieser Methode zu transformieren, muss der Stamm ein Konstrukt zur zusätzlichen Expression enthalten. Dieses Konstrukt enthält einen induzierbaren Promotor und entweder eines der Gene *comK*, *comS*, *dprA* oder eine Kombination dieser Gene. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich  $P_{mtA}$ -*comK*-*comS* verwendet und durch die Zugabe von Mannitol aktiviert. Es wurde aber auch das Konstrukt  $P_{licB}$ -*comK*-*comS* verwendet, das durch die Zugabe von Cellibiose aktiviert wurde.

Für die Transformation wurde zunächst eine ÜK in LB Medium angezogen, um daraus eine TK mit einer Zelldichte von  $OD_{600}$  0,1 anzuimpfen. Nach einer Inkubation der TK von 1,5 h bei 37 °C (Schüttler, 150 rpm) erfolgte die Zugabe des Induktors (Mannitol oder Cellibiose) in einer Endkonzentration von 0,5 % (w/v). Danach wurde die Kultur nochmals für 1,5 h bei 37 °C (Schüttler, 150 rpm) inkubiert. Zur Entfernung des Induktors wurde die Kultur gewaschen, in  $LB_0$  resuspendiert und auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 verdünnt. Zu 1 ml Kultur wurde daraufhin DNA (identisch zu Kapitel 2.3.3.2) gegeben, für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Platten mit geeignetem Selektivmedium ausplattiert. Bei der Transformation mit Plasmiden als Donor-DNA wurden 50 µl bis 100 µl ausplattiert. Bei der Transformation mit DNA aus dem Stamm KM0 ( $Trp^+$ ), wurde die Kultur gewaschen und in sterilen 1 % NaCl resuspendiert. Davon wurden 50 µl bis 100 µl mit einer Verdünnung von 1:100 ausplattiert (Rahmer *et al.*, 2015).

### 2.3.4 Untersuchung kompetenter Zellen mit dem Mikroskop

Das Ziel der Mikroskopie bestand in der Darstellung und besseren Untersuchung kompetenter Zellen. Die Zellen wurden entweder mit einem Auflicht- und Fluoreszenzmikroskop oder mit einem Konfokalmikroskop untersucht. Für Letzteres mussten die Zellen und das Deckgläschen fixiert werden.

#### 2.3.4.1 Fixierung und Färbung

Um die Zellen zu fixieren, wurde 1 ml 1 % ige Agarose in H<sub>2</sub>O auf einen Objektträger gegeben, ein weiterer Objektträger oben aufgelegt und ca. 20 min gewartet bis die Agarose ausgehärtet war. Nach Entfernen des zweiten Objektträgers wurden 3 µl der Zellen auf die Agarose pipettiert und mit einem Deckgläschen beschichtet.

Für die Konfokalmikroskopie wurde die Membran der Zellen mit FM4-64 (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino)Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide) rot fluoreszierend und die DNA mit DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol) blau fluoreszierend gefärbt. Dafür wurden die Zellen der TK abzentrifugiert und anschließend in FM4-64 (5 µg/ml in HBSS (1x)) für 1 Minute auf Eis inkubiert. 3 µl der Zellen wurden anschließend zusammen mit 2 µl DAPI (1 µg/ml in PBS) auf den mit Agarose beschichteten Objektträger getropft und dunkel gelagert.

#### 2.3.4.2 Detektion

Die Zellen wurden mit dem Zeiss Axioplan 2 sowohl mit Durchlicht als auch unter Fluoreszenzlicht mit 100-facher Vergrößerung (100x 1,3 Öl, Plan-NEOFLUAR<sup>®</sup> Ph3) durch das Ölimmersionsobjektiv (Immersol; Zeiss, Jena, Deutschland) betrachtet und digital fotografiert (Zeiss Axio Cam MRm).

Um sowohl eine detailliertere Aufnahme der Zellen zu erhalten, als auch kompetente Zellen mittels eines fluoreszenz-markierten DNA-Aufnahmekomplexes identifizieren zu können, wurden die Zellen mit dem Laser Scanning Konfokal Mikroskop (LSM710 AxioObserver, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 63-fachen Objektiv (Plan-Apochromat 1,4 ) mit Ölimmersion (Immersol; Zeiss, Jena, Deutschland) mikroskopiert. Für DAPI erfolgte die Anregung mit dem Argonlaser bei 405 nm und die Emissionsdetektion bei 460 nm, für GFP war die Anregung bei 488 nm und Emission

bei 505-530 nm und für FM4-64 war die Anregung bei 514 nm und die Emission bei 640 nm. Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend mit dem Programm ZEN2012 (Zeiss) bearbeitet.

## 2.4 Molekulargenetische Methoden

### 2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte über die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Für die Amplifikation von Fragmenten, die für Klonierungen verwendeten werden, wurde zunächst der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ mit einer *Taq* DNA-Polymerase und einer thermostabilen DNA-Polymerase verwendet. Diese zeichnet sich durch eine Korrekturlese-Funktion (engl. *proof-reading*) aus, welche falsch eingebaute Nukleotide erkennt und über eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität wieder aus der DNA entfernt. Später wurde die „Phusion<sup>®</sup> Hot Start DNA-Polymerase“ genutzt, eine modifizierte Form der PCR, welche unspezifische Amplifikate vermeidet, da die Polymerase bei niedriger Temperatur zunächst inaktiv ist. Schließlich wurde auch die „Q5<sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase“ verwendet, bei der die Polymerase mit einer Stabilitätsverbessernden Domäne fusioniert ist und somit robuster ist. Um Deletionen oder chromosomale Integrationen nachzuweisen zu können, wurde die „DreamTaq DNA-Polymerase“ verwendet, welche keine *proof-reading*-Aktivität besitzt. Die PCR-Ansätze sowie die PCR-Profile für die Amplifikationen sind in der Tabelle 17 und Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 17: Zusammensetzung der PCR-Ansätze mit dem High Fidelity PCR Enzyme Mix und der Phusion<sup>®</sup> Hot Start DNA-Polymerase.**

Komponente	Volumen für High Fidelity PCR Enzyme Mix	Volumen für Phusion <sup>®</sup> Hot Start DNA-Polymerase
Template-DNA (Plasmid-DNA ca. 5 ng Plasmid-DNA, chromosomale DNA ca. 100 ng)	x µl	x µl
Puffer	10 µl	20 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl	2 µl
<i>forward</i> -Primer (100 µM)	1 µl	1 µl
<i>reverse</i> -Primer (100 µM)	1 µl	1 µl
DNA-Polymerase	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 100 µl	ad 100 µl

**Tabelle 18: Zusammensetzung der PCR-Ansätze mit der Q5™ High-Fidelity und DreamTaq DNA-Polymerase.**

Komponente	Volumen für Q5™ High-Fidelity DNA Polymerase	Volumen für DreamTaq DNA-Polymerase
Template-DNA (Plasmid-DNA ca. 5 ng Plasmid-DNA, chromo- somale DNA ca. 100 ng)	x µl	x µl
Puffer	10 µl	3 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	0,6 µl
<i>forward</i> -Primer (100 µM)	0,5 µl	0,3 µl
<i>reverse</i> -Primer (100 µM)	0,5 µl	0,3 µl
DNA-Polymerase	0,5 µl	0,3 µl
H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 50 µl	ad 30 µl

### 2.4.1.1 Verwendete Polymerasen

Für die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde der Personal Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) mit folgenden Temperaturprofilen verwendet:

#### High Fidelity PCR Enzyme Mix

Denaturierung	94 °C	3 min	} 30-35 Zyklen
Denaturierung	92 °C	1 min	
Primer-Annealing	variabel	1 min	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	5-10 min	

#### Phusion® Hot Start DNA-Polymerase

Denaturierung	98 °C	30 s	} 30-35 Zyklen
Denaturierung	98 °C	10 s	
Primer-Annealing	variabel	20 s	
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	7 min	

#### Q5™ High-Fidelity DNA-Polymerase

Denaturierung	98 °C	30 s	} 30-35 Zyklen
Denaturierung	98 °C	10 s	
Primer-Annealing	variabel	30 s	
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	2 min	

**DreamTaq DNA-Polymerase**

Denaturierung	94 °C	1,5 min	} 30-35 Zyklen
Denaturierung	92 °C	30 s	
Primer-Annealing	variabel	30 s	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

**2.4.1.2 Kolonie PCR**

Die Kolonie-PCR ist eine einfache Methode, um Deletionen oder Insertionen nachzuweisen. Dabei ist die Aufreinigung der chromosomalen DNA nicht notwendig. Bei dieser Methode wurde zunächst Zellmaterial einer Kolonie in 100 µl TE 10.01 aufgenommen, die Zellsuspension für 15 min bei 99 °C inkubiert (Eppendorf Thermomixer compact) und kurz gemischt. Für weitere 20 bis 30 min wurde die Zellsuspension bei -70°C schockgefroren, daraufhin für 10 min bei 99 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 10 min, 13.200 rpm, RT). 10 µl des DNA-haltigen Überstandes wurden als Template für einen PCR-Ansatz mit der Dream-Taq DNA-Polymerase verwendet.

**2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Analyse der DNA-Fragmentgrößen erfolgte durch eine Elektrophorese in 0,8 bis 1,2 % igen (v/w) Agarosegelen aus LE-Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessische Oldendorf) und 1x TAE-Puffer. Zum Anfärben der DNA wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µg ml<sup>-1</sup> zu dem abgekühlten, aber noch flüssigen Gel hinzugegeben. Als Laufpuffer diente 10x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde vor dem Auftragen mit 1x DNA-Auftragspuffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der Proben-DNA wurde bei jedem Lauf 5 µl des „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“ (Thermo Scientific) verwendet. Bei einer angelegten Spannung von 10 V pro cm Gellänge erfolgte die Gelelektrophorese.

### 2.4.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte die Reinigung mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit“ nach Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 20-30 µl Elutionspuffer (vom Hersteller) eluiert.

### 2.4.4 Restriktionsverdau

Bei einem Restriktionsverdau werden Plasmid-DNA oder PCR-Fragmente mit Hilfe von einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten. Die Ansätze betragen 10 µl und enthielten ca. 200 ng gereinigte DNA. Nach Zugabe von 1 µl Restriktionsenzym (i.d.R. 10 U/µl), 1 µl 10x Restriktionspuffer und H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub> wurde der Ansatz für ca. 1 h bei optimaler Temperatur inkubiert. Wenn die DNA mit weiteren Enzymen geschnitten werden musste und die Puffer unterschiedliche Zusammensetzung hatten, wurde die DNA mit Isopropanol gefällt und eine weitere Restriktion angesetzt (siehe Kapitel 2.4.5). Falls kein Unterschied bestand und die Schnittstellen mindestens 50 bp voneinander entfernt lagen, sodass man die Wirkung der beiden Enzyme auf einem Agarosegel sichtbar machen konnte, wurde ein 20 µl Ansatz mit beiden Enzymen verwendet. Ansonsten wurde zunächst ein Enzym verwendet und (falls möglich) anschließend das Enzym durch Hitze inaktiviert. Daraufhin wurde nochmals 8 µl H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub>, 1 µl 10x Restriktionspuffer und 1 µl des zweiten Restriktionsenzymen dazu gegeben und eine weitere Stunde bei Temperaturoptimum inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte entweder durch eine Isopropanolfällung oder direkt mithilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits nach Protokoll des Herstellers.

### 2.4.5 Isopropanolfällung

Die Isopropanolfällung diente hier zur Trennung der DNA von Restriktionsenzymen und deren Puffern nach dem Restriktionsverdau. Dafür gab man 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 6,2) und 1 Volumen Isopropanol zu dem Restriktionsansatz und inkubierte dies 5 min bei RT. Anschließend wurde die DNA pelletiert (Tischzentrifuge, 13.200 rpm, 10 min, RT), das Pellet mit 10 µl 100% Ethanol gewaschen (Tischzentrifuge, 13.200 rpm, 1 min, RT), bei RT ca. 30 min getrocknet und in 8 µl bzw. 16 µl TE 10.01 resuspendiert.

## 2.4.6 Modifikation von DNA-Enden

### 2.4.6.1 Behandlung mit der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (aus dem Kälberdarm) spaltet die 5'-Phosphatgruppe von linearisierter DNA ab und verhindert, dass es zu einer Religation der Vektor-DNA kommt. Dafür wird 1  $\mu\text{l}$  alkalische Phosphatase ( $10 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  10x Phosphatasepuffer zu 8  $\mu\text{l}$  der gefällten DNA pipettiert und der Ansatz bei 37 °C für 45 min inkubiert.

### 2.4.6.2 Behandlung mit dem Klenow Enzym

Als Klenow-Fragment wird die große Untereinheit der DNA Polymerase I (aus *E. coli*) bezeichnet, die eine 5'→3' Polymerase-Aktivität und eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität besitzt. Das Klenow-Enzym wurde dazu verwendet, um die überstehenden 5'-Enden von DNA-Fragmenten aufzufüllen, das eine darauffolgende „blunt-end“-Klonierung ermöglicht. Dafür wurde die DNA mit 1  $\mu\text{l}$  10x Restriktionspuffer B (Roche), 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix und 1  $\mu\text{l}$  Klenow Enzym ( $1 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ ) versetzt und anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$  auf 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Abschließend wurde der Restriktionsansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert.

## 2.4.7 Ligation

Die Ligation ist eine enzymkatalysierte Verknüpfung von kompatiblen DNA-Enden mit Hilfe der T4 DNA Ligase. Der Reaktionsansatz (10  $\mu\text{l}$ ) enthielt Vektor- und Insert-DNA, in einem molaren Verhältnis von 1:3, 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase ( $5 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  10x Ligasepuffer und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ . Die Ligation erfolgte für 2 h bei RT.

## 2.4.8 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus 5 ml bzw. 10 ml ÜK (i.d.R. *E. coli* JM109 bzw. NM538) wurde mit dem „innuPREP Plasmid Mini Kit“ von Analytic Jena nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Plasmide wurden bei 4 °C bzw. -70 °C gelagert.



Die Analyse der Plasmide wurde mit einer kostengünstigeren Biofeedback-Methode durchgeführt. Dafür wurden 2 ml der *E. coli* ÜK abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT), das Zellpellet in 200 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Durch die anschließende Zugabe von 300 µl Lysepuffer erfolgten der Zellaufschluss und die Denaturierung von Proteinen und chromosomaler DNA. Nach Zugabe von 400 µl Neutralisierungspuffer und anschließender Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.200 rpm, 5 min, RT) wurden Zelltrümmer, Proteine sowie die chromosomale DNA pelletiert. 800 µl des Überstandes wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 700 µl Isopropanol überführt und für 10 min bei RT inkubiert, wodurch die Plasmid-DNA gefällt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.200 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen und die pelletierte Plasmid-DNA mit 100 µl 100 % Ethanol gewaschen (Tischzentrifuge, 13.200 rpm, 1 min, RT). Zum Schluss wurde die Plasmid-DNA für ca. 30 min getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub> resuspendiert. Zum Restriktionsverdau wurden 8 µl bzw. 16 µl der Plasmid-DNA verwendet.

#### 2.4.9 Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *B. subtilis* erfolgte mit dem „DNeasy® Blood & Tissue Kit“ aus 4 OD<sub>600</sub> einer ÜK in LB-Medium nach Protokoll des Herstellers. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgte bei 4 °C.

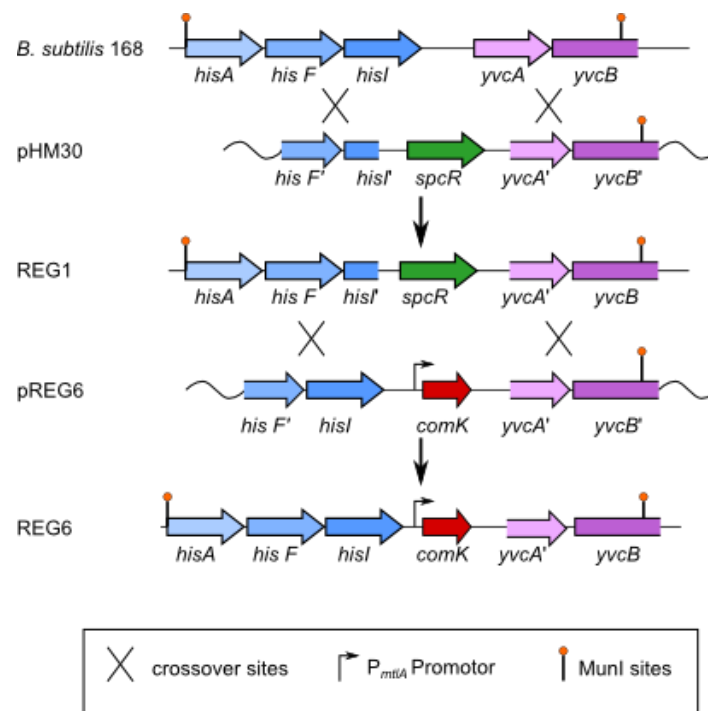
#### 2.4.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die Probenvorbereitung wurde nach Vorschrift des Anbieters durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „GATCViewer™“ (GATC Biotech, Konstanz) und Clone Manager Basic Version 8 Software (Sci-Ed Software, Cary, NC USA).

#### 2.4.11 Markerfreie chromosomale Integration in *B. subtilis*

Die Methode der markerfreien chromosomalen Integration in *B. subtilis* von Motejadded und Altenbuchner (Motejadded & Altenbuchner, 2007) wurde für die Integration verschiedener Gene zusammen mit einem Mannitol bzw. Cellibiose induzier-

baren Promotor verwendet. Eine schematische Darstellung für die Integration von *comK* mit dem Promotor  $P_{mtlA}$  ist in Abbildung 14 dargestellt. Für die markerfreie chromosomale Integration wurde zunächst der gewünschte *B. subtilis* Stamm mit dem Plasmid pHM30 nach der Transformationsmethode von Anagnostopoulos und Spizizen transformiert (Kapitel 2.3.3.2). Mittels eines Doppelcrossover wurde am 3'-Ende des *his*-Operons eine Spectinomycin Resistenzkassette integriert, wodurch das letzte und ein Teil des vorletzten *his*-Genes entfernt wurden. Dadurch wurden die Zellen sowohl Spectinomycin resistent als auch Histidin auxotroph. Eine weitere Transformation nach Anagnostopoulos und Spizizen mit pREG6 als Beispiel führt ebenfalls über ein Doppelcrossover Ereignis dazu, dass das Spectinomycin Resistenzgen durch das Gen *comK* mit angefügtem  $P_{mtlA}$  ersetzt wird und die *his*-Gene wieder vollständig im Genom vorliegen. Die Mutanten wurden zunächst auf einer Platte bestehend aus Minimal Medium ohne Histidin selektioniert und anschließend mittels einer Kolonie-PCR überprüft.



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der Integration des  $P_{mtlA}$  Promotors zusammen mit dem *comK* Gen (verändert nach Motejadded & Altenbuchner, 2007). Gezeigt ist der Ablauf zweier aufeinander folgender Integrationen, zuerst von pHM30 und dann von pREG6, in das *B. subtilis* 168 Chromosom.

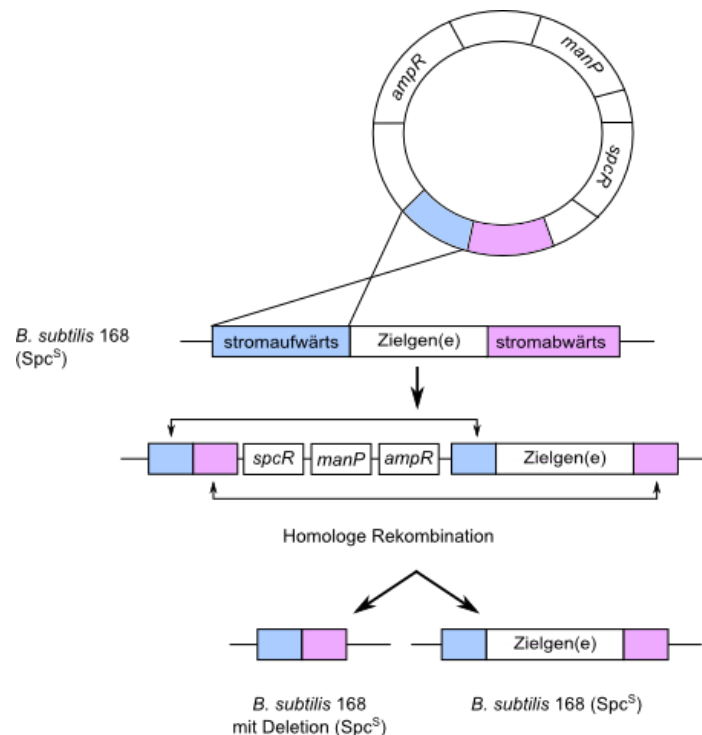
### 2.4.12 Markerfreies genetisches Engineering des *B. subtilis* Chromosoms

Um gezielt Regionen im Genom von *B. subtilis* zu verändern, wurde die Methode von Wenzel und Altenbuchner (Wenzel & Altenbuchner, 2015) verwendet. Dafür wurde zunächst eine Kasette aus den flankierenden Regionen (jeweils ca. 700 bp) des zu manipulierenden Bereichs über eine 3-Fragment Ligation in den positiven Selektionsvektor pJOE4786.1 gebracht (Jeske & Altenbuchner, 2010). Die Sequenz der Kasette wurde mittels DNA-Sequenzierung geprüft und anschließend über die identischen äußeren Schnittstellen in den positiven Selektionsvektor pJOE6743.1 subkloniert, da dieser Vektor nicht in Lage ist, sich autonom in *B. subtilis* zu replizieren.

Um mit dieser Methode eine Integration eines gewünschten Bereichs zu erzeugen, wurde zunächst dieser Bereich (ca. 1400 bp) in den positiven Selektionsvektor pJOE4786.1 gebracht (Jeske & Altenbuchner, 2010). Falls der eingefügte Bereich keine passende Restriktionsschnittstelle im mittleren Teil aufwies, wurde der Bereich in 2 Fragmente (jeweils ca. 700 bp) aufgeteilt. Darüber konnte eine passende Restriktionsschnittstelle eingefügt werden und mittels einer 3-Fragment Ligation die Kasette in den positiven Selektionsvektor pJOE4786.1 gebracht werden. Über identische Restriktionsschnittstellen am äußeren Rand der zu integrierenden Kasette und zwischen den zwei Fragmenten im eingefügten Bereich wurde die Kasette ebenfalls in den Vektor kloniert und nach einer Prüfung der DNA-Sequenz in den positiven Selektionsvektor pJOE6743.1 subkloniert.

Die Vektoren zur gezielten Veränderung wurden in *B. subtilis* REG1 nach der Transformationsmethode von Anagnostopoulos und Spizizen (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961) transformiert. Die Mutante trug daraufhin eine Deletion im Gen *manPA* und die Transformation konnte über eine Spectinomycinresistenz selektioniert werden. Die Spectinomycinresistenz erhält der Stamm durch ein einfaches Crossover zwischen einer der beiden homologen Sequenzen von Vektor und Chromosom, wobei der Vektor vollständig in das Chromosom integriert. In der anschließenden Inkubation über Nacht (Roller, 37°C) in 1 ml LB-Medium ohne Selektion kann es zu einem weiteren, spontanen intramolekularen Crossover-Ereignis kommen, wodurch das Plasmid wieder eliminiert wird. Je nach verwendeten homologen Sequenzen erfolgte dies entweder mit oder ohne den zu manipulierenden Genbereich. Der Verlust des Plasmids wurde zunächst über die Zugabe von Mannose (0,5 % w/v) zum Flüssigmedium (1 ml) während einer 8 stündigen Inkubation (Roller, 37 °C) erzwungen und anschließend auf LB-

Agarplatten mit Mannose selektioniert. Der Stamm wurde dafür ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der verwendete Integrationsvektor enthält das *manP*-Strukturgen des *B. subtilis* Mannose-Operons, welches zur Aufnahme von Mannose in die Zelle benötigt wird. Da die Zellen jedoch über keine Mannose-6-Phosphat-Isomerase verfügen ( $\Delta manA$ ), können sie das aufgenommene Mannose-6-Phosphat nicht metabolisieren und es kommt zu einem toxischen Effekt. Der toxische Effekt resultiert möglicherweise aus einem zu hohen osmotischen Druck, der auf einer intrazellulären Akkumulation von Mannose-6-Phosphat beruht (Wenzel *et al.*, 2011). Die auf Mannose wachsenden Zellen wurden zunächst auf eine Spectinomycinresistenz getestet und Spectinomycin sensitive Zellen mittels einer Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Manipulation überprüft.



**Abbildung 15: Gendeletion mittels Integrationsvektoren.** Schema abgeändert nach Fehér *et al.*, 2007

### 2.4.13 Gendeletion mit Hilfe erworbener BKE-Stämme

Das *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC) stellt genetisch charakterisierte *B. subtilis* Stämme zur Verfügung. Bei den BKE-Stämmen handelt es sich um eine Bibliothek von Stämmen, bei der jedes einzelne, nicht-essentielle Gen durch ein Erythromycin Resistenzgen ersetzt wurde. Um ein gewünschtes Gen in einem *B. subtilis* Stamm zu deletieren, wurde zunächst die chromosomale DNA des entsprechenden BKE-Stammes

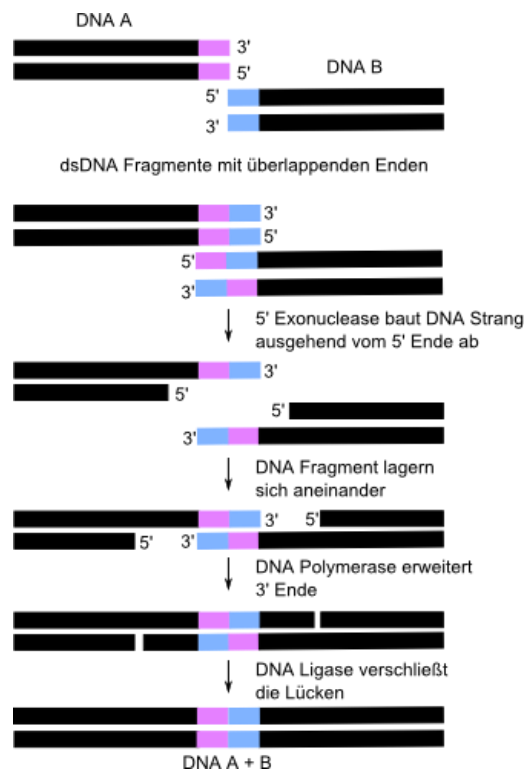
mittels dem DNeasy® Blood & Tissue Kit von QUIAGEN (Hilden) isoliert. Anschließend wurde der Stamm mit dieser DNA oder einem entsprechenden PCR-Fragment mit dem Erythromycin Resistenzgen sowie ca. 700 bp langen flankierende Sequenz transformiert und mittels Erythromycin selektiert. Die Transformation erfolgte mit der Methode in LB-Medium, wenn der Stamm ein Konstrukt zur zusätzlichen Expression von *comK* und *comS* mittels eines induzierbaren Promotors enthält. Ansonsten erfolgte die Transformation nach der Methode von Anagnostopoulos und Spizizen (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Eine erfolgreiche Integration dieser Kasette wurde zusätzlich über eine Kolonie-PCR bestätigt. Da *loxP* Sequenzen für die *site*-spezifische Rekombinase Cre das Erythromycin Resistenzgen flankieren, konnte durch ein funktionelles *cre* Gen die Erythromycin Resistenz entfernt werden. Dafür wurde der Stamm mit dem Plasmid pJOE6732 transformiert (entweder mit der LB- oder der Anagnostopoulos und Spizizen-Methode) und mittels Spectinomycin selektiert. Die Replikation des Plasmides pJOE6732 ist instabil, wodurch das Plasmid wieder entfernt werden konnte. Dafür wurden spectinomycinresistente Kolonien in 5 ml LB-Medium ohne Selektionsdruck bei 37 °C für mehrere Generationen wachsen gelassen und anschließend auf LB-Platten ohne Antibiotikazugabe verdünnt ausplattiert.

#### 2.4.14 Deletion mittels Gibson Assembly® von NEB

Die Gibson Assembly (GA) Methode dient dazu, doppelsträngige DNA-Fragmente über überlappende DNA-Sequenzen aneinanderzufügen. Dafür wurde zunächst ein Reaktionsansatz wie in Tabelle 19 auf Eis zusammengestellt und anschließend für 15 min bei 50 °C inkubiert. Die Inkubationszeit verlängert sich auf 60 min, wenn 4 bis 6 Fragmente assembliert werden sollen. Während der Inkubation baut eine 5'-Exonuklease die Enden des DNA-Doppelstrangs ab, sodass 3'-überhängende Einzelstränge (*sticky ends*) entstehen. Diese können mit komplementären einzelsträngigen Bereichen hybridisieren. Die darüber entstandenen Einzelstranglücken werden anschließend von der  $\phi$ 29-DNA-Polymerase aufgefüllt. Eine Ligase verbindet zum Schluss die erzeugten DNA-Sequenzen kovalent. 2  $\mu$ l dieser darüber entstandenen doppelsträngigen DNA wurde nun in *B. subtilis* transformiert, entweder mit der LB- oder der Anagnostopoulos und Spizizen-Methode und selektiert. Mittels eines Doppelcrossovers konnte daraufhin eine Deletion in den entsprechenden Genen erzeugt werden.

**Tabelle 19: Zusammensetzung des Gibson Assembly Reaktionsansatzes.** Der GA Mastermix enthält eine T5 Exonuklease, eine Phusion-Polymerase, eine Taq-DNA-Ligase und einen isothermalen Reaktionspuffer.

	Reaktionsmenge
PCR-Fragment(e) + linearisierter Vektor	2-10 $\mu$ l (entspricht 0,02 – 0,5 pmol)
GA Master Mix (2x)	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	ad 20 $\mu$ l



**Abbildung 16: Verbindung zweier DNA-Fragmente mittels Gibson Assembly.** Schematische Darstellung nach dem NEB Protokoll für Gibson Assembly.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung einer Methode zur Transformation von *B. subtilis* in Vollmedium

Üblicherweise wird die Kompetenz in *B. subtilis* über Quorum sensing Signale und Nahrungsmangel aktiviert. Dies geschieht insbesondere nach einer Kultivierung in Minimalmedium, während in Vollmedium keine Kompetenzentwicklung festzustellen ist. Anagnostopoulos und Spizizen entwickelten eine Zwei-Schritt-Methode. Dabei werden die Zellen bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase in aminosäurereichem Minimalmedium angezogen (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Anschließend werden sie in aminosäurearmes Minimalmedium überimpft und für 90 min inkubiert. Diese Methode wird in dieser Arbeit als MG-Methode bezeichnet. Durch genetische Veränderungen im Differenzierungsprozess der Zellen kann die komplexe Entstehung der Kompetenz gestört werden, wodurch die Zellen keine DNA mehr aufnehmen können. Um die Fähigkeit der DNA Aufnahme unabhängig von diesen Faktoren zu aktivieren, kann man die Expression unterschiedlicher Kompetenzfaktoren durch Zugabe von Induktoren künstlich stimulieren (Nijland *et al.*, 2010; Hahn *et al.*, 1996; Zhang & Zhang, 2011; Duitman *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1996). Dabei zeigte sich, dass insbesondere die künstlich stimulierte Expression von *comK*, dem für die Expression der Kompetenz verantwortlichen Transkriptionsfaktor, zu einer Verbesserung der Transformationsrate führt.

#### 3.1.1 Transformation von *B. subtilis* in LB-Medium mit Hilfe eines Mannitol induzierbaren *comK* Gens

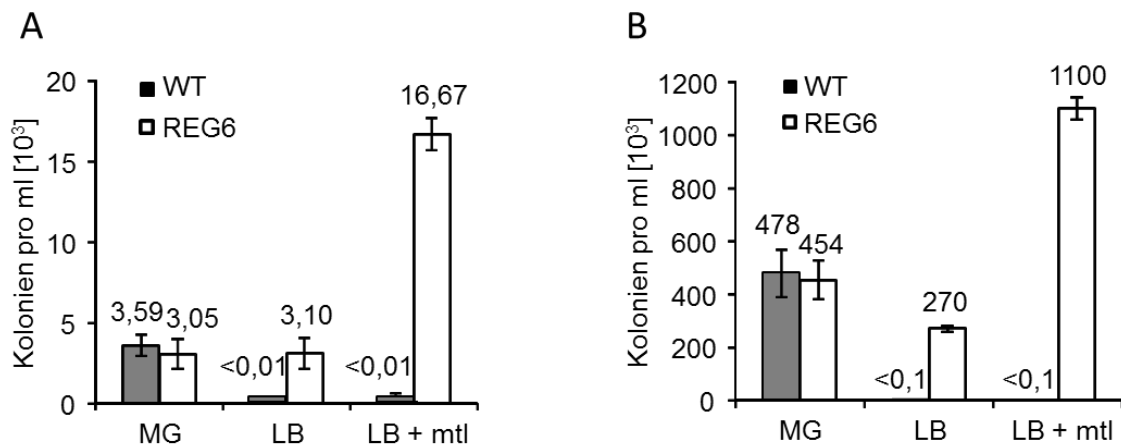
Um ein weiteres *comK* Gen sowie weitere Gene in das Chromosom von *B. subtilis* einzufügen, wurde eine in dem Institut für Industrielle Genetik (Universität Stuttgart) entwickelte markerfreie Integrationsmethode verwendet (Motejadded & Altenbuchner, 2007). Dafür wurde zunächst das Plasmid pHM30 über eine homologe Rekombination an das Ende des Histidin-Operons (*his*) von dem Stamm *B. subtilis* Stamm 168 eingefügt (REG1). Die Selektion der Integration erfolgte über eine Spectinomycinresistenz. Das Plasmid pHM30 enthält neben der C-terminalen Sequenz von *hisF* nur ein unvollständiges *hisI* Gen, das letzte Gen im *his*-Operon. Anschließend folgt das spectinomycin

Resistenzgen, das N-terminal deletierte *yvcA* und das *yvcB* Gen. Diese folgen auch unmittelbar auf das *his*-Operon im Chromosom von *B. subtilis*. Das Gen *yvcA* ist nicht essentiell und an der komplexen Koloniebildung beteiligt, die Funktion von *yvcB* ist unbekannt (Verhamme *et al.*, 2009). Durch die Integration von pHM30 wird der Stamm spectinomycinresistent und Histidin auxotroph. Das Gen *comK* inklusive der ribosomalen Bindungsstelle wurde mittels PCR (Oligonukleotide s8007, s8008) amplifiziert und so in das Plasmid pKAM180 eingebracht, dass die Transkription unter der Kontrolle des Mannitol induzierbaren Promotors ist. Dafür wurde das Lumineszenzgen durch das *comK* Gen ersetzt, indem es über *AflII* und *NheI* ausgeschnitten wurde (pREG6). Das Plasmid pREG6 ist in Teilen identisch zu dem Plasmid pHM30, jedoch ist das Gen *hisI* in seiner Sequenz vollständig und das Gen für die Antibiotikaresistenz gegen Spectinomycin durch das Konstrukt aus dem Mannitol induzierbaren Promotor ( $P_{mtlA}$ ) mit dem Gen *comK* ersetzt (siehe Kapitel 2.4.11). Der Promotor  $P_{mtlA}$  ist nicht der native Promotor aus *B. subtilis* 168, sondern ein in der „*leader*“-Sequenz verkürzter Promotor aus *B. subtilis* 3NA, der sich durch eine im Vergleich zum nativen Promotor höhere Aktivität auszeichnet (Heravi, 2013). REG1 wurde mit dem Plasmid pREG6 transformiert (REG6) und auf MG-Platten auf Histidin prototrophe Zellen selektioniert. Durch ein Doppelcrossover wurde das *his*-Operon wieder vervollständigt. Zudem wurde das Konstrukt aus  $P_{mtlA}$ -*comK* in das Genom zwischen *hisI* und *yvcA* eingefügt und das Spectinomycin Resistenzgen entfernt. Somit lag neben dem natürlichen *comK* Gen ein weiteres *comK* Gen im Genom vor.

Für diesen Stamm (REG6) wurde ein neues Transformationsprotokoll in „*lysogeny broth*“-Medium (LB-Medium) entwickelt (siehe Kapitel 2.3.3.3). Um die Transformationsraten von *B. subtilis* 168 (WT) und REG6 vergleichen zu können, wurden die Zellen nach der MG-Methode und der neu entwickelten Methode (LB-Methode) transformiert. Als Donor-DNA diente entweder das Plasmid pWAL275, ein pUB110-pUC18 Derivat in Dimerkonformation (Lydia Warth, nicht veröffentlicht) oder chromosomale DNA eines *trpC*<sup>+</sup> Derivats von *B. subtilis* 168 (KM0). Bei Transformationen mit dem Plasmid pWAL275 wurden die Transformanten auf LB-Agar Platten mit Kanamycin ( $5 \mu\text{g/ml}^{-1}$ ) und mit chromosomaler DNA aus dem Stamm KM0 auf MG Platten ohne Tryptophan selektioniert und darüber die Transformationsrate ermittelt. Die Transformationsrate beschreibt die Anzahl der auf den Platten gewachsenen Kolonien pro Milliliter (ml) Kultur bei DNA-Zugabe. Über die angegebene optische Dichte zum Zeit-



punkt des Ausplattierens konnte auch die Transformationsrate pro Anzahl Zellen ermittelt werden. Die Anzahl der Kolonien pro ml Medium ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Vergleich der Transformationsrate von *B. subtilis* 168 (WT) und REG6 ( $P_{mdA-comK}$ ).** Die Transformation wurde nach der Paris Methode in MG-Medium und nach dem neuen Protokoll in LB Medium mit und ohne Mannitol Zugabe durchgeführt. Als Donor-DNA dienten in (A) 100 ng des Plasmids pWAL275 in Dimerkonformation und in (B) 3  $\mu$ g der chromosomalen DNA des Stammes KM0. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

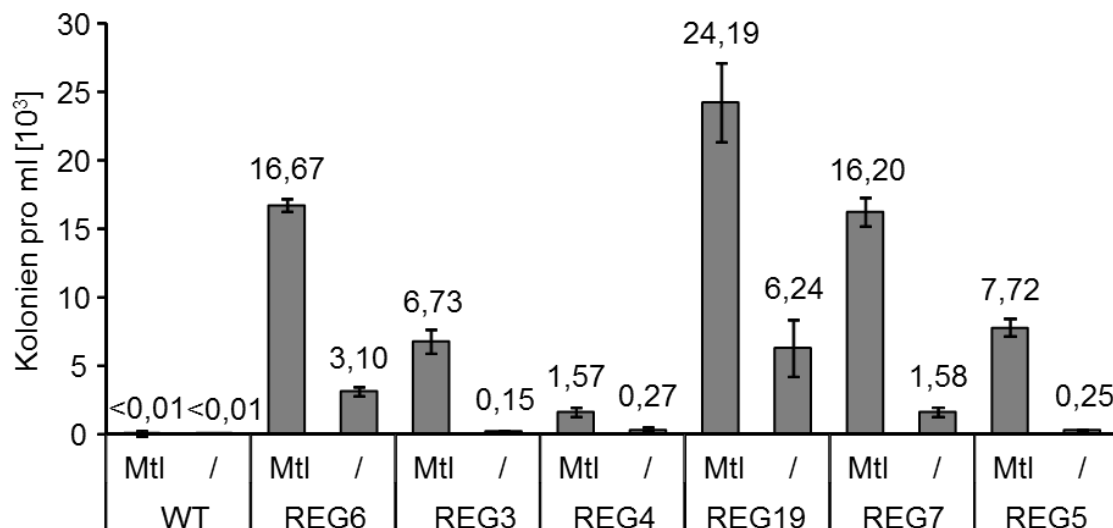
Die Transformationsrate mit chromosomaler DNA war circa 100-fach höher als mit Plasmid DNA. Dieses wurde auch schon von Canosi *et al.* (1978) und Dubnau *et al.* (1980) festgestellt (Canosi *et al.*, 1978; Zadrazil & Sponar, 1980). Wenn die Zellen nach der MG-Methode transformiert wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT und REG6. Wie zu erwarten, ergab die Transformation des WTs keine oder nur sehr wenige Kolonien nach der Anzucht im LB-Medium, unabhängig von der Mannitol Zugabe. Ein anderes Bild zeigte sich bei dem Stamm REG6. Wurde dieser Stamm nach Anzucht in LB-Medium ohne Zugabe von Mannitol transformiert, war die Transformationsrate bereits fast identisch zur Anzucht in MG Medium. Wenn Mannitol bei der Anzucht zu dem Medium hinzugegeben wurde, war die Transformationsrate signifikant gesteigert, d.h. um das 4,6-fache bei der Plasmid-DNA und um das 2,3-fache bei der chromosomalen DNA.

### 3.1.2 Austesten verschiedener, mit Mannitol induzierbarer Kompetenzfaktoren auf die Transformation von *B. subtilis*

Die Transformation von *B. subtilis* ist neben ComK von weiteren Faktoren abhängig, z.B. von ComS und DprA. ComS ist ein Antiadaptorprotein, das die Degradation von ComK verhindert. DprA schützt die aufgenommene einzelsträngige DNA und überträgt diese an RecA. Dieses Protein ist wiederum notwendig für die Rekombination, d.h. für die Integration der aufgenommenen chromosomalen DNA in das Genom über homologe Sequenzen.

Um auszutesten, ob eine Erhöhung der Transformationsrate erreicht werden kann, wurden weitere Gene (*comS* und *dprA*) und Genkombinationen (*comS-dprA*, *comK-comS*, *comK-dprA*) ausgetestet. Zunächst wurden die Gene *comS* (Oligonukleotide s8003, s8004) und *dprA* (Oligonukleotide s8005, s8006) mittels PCR amplifiziert und in pKAM180 eingefügt. Dafür wurde das Lumineszenzgen, über die Schnittstellen *AflIII* und *NheI*, durch das jeweilige Gen ersetzt (*comS*: pREG3, *dprA*: pREG4). Die Genkombination aus *comS-dprA* (pREG5) wurde erzeugt, indem das *dprA* Amplifikat über die *BsrGI* Schnittstelle in das pREG3 Plasmid eingefügt wurde. Das Plasmid pJOE7361 mit der Genkombination von *comK-comS* unter dem  $P_{m1A}$  Promotor wurde von Dr. Josef Altenbuchner zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid wurde erzeugt, indem das  $P_{m1A-comK}$  DNA Fragment aus dem Plasmid pJOE6905 mittels einer PCR und den Oligonukleotiden s6851 und s7853 und das Gen *comS* mit den Oligonukleotide s7708 und s7709 aus *B. subtilis* 168 amplifiziert wurde. Beide PCR Fragmente wurden mit Hilfe einer PCR und den Oligonukleotiden s6851 und s7709 fusioniert und in den Vektor pJOE4786 über *SmaI* Schnittstellen (pJOE7331) eingefügt. Abschließend wurde die Kassette aus  $P_{m1A-comK-comS}$  über die *BamHI* Schnittstellen aus dem Plasmid pJOE7331 in den pHM31 Vektor eingefügt (pJOE7361). Die Genkombination aus *comK-dprA* (pREG7) wurde erzeugt, indem das *dprA* Amplifikat (Oligonukleotide: s10576 und s10577) über die *NheI* Schnittstelle in das pREG6 Plasmid eingefügt wurde. Der Stamm REG1 wurde anschließend mit diesen Plasmiden transformiert (*comS*: REG3, *dprA*: REG4, *dprA-comS*: REG5; *comK-dprA*: REG7, *comK*, *comS*: REG19) und mit MG-Platten auf Histidin prototrophe Zellen selektioniert. Durch ein Doppelcrossover wurde das *his*-Operon wieder vervollständigt. Zudem wurden die gewünschten Gene bzw. Genkombinationen in das Genom zwischen *hisI* und *yvcA* eingefügt und das Spectinomycin Resistenzgen entfernt.

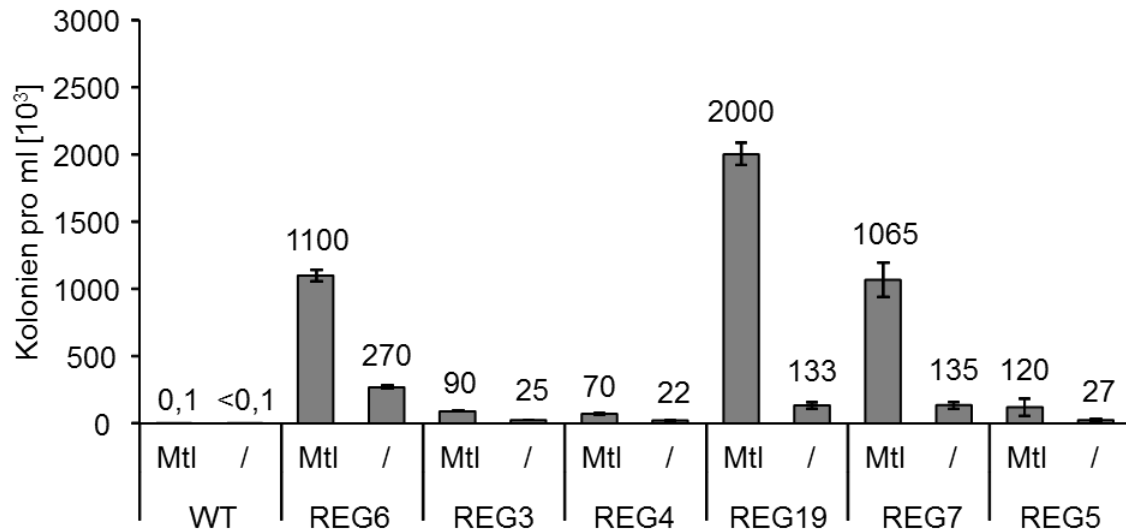
Alle Stämme wurden in LB Medium mit und ohne Mannitol-Induktion angezogen und transformiert. Als Donor-DNA diente das Plasmid pWAL275 in Dimerkonformation. Das Ergebnis der Transformation mit Plasmid-DNA ist in Abbildung 18 dargestellt. Wie bereits in Abbildung 17 gezeigt, führte die zusätzliche  $P_{mnlA}$  bedingte *comK* Expression zu einer Steigerung der Zahl der Transformanten. Auch die Expression von *comS* und *dprA* durch  $P_{mnlA}$  führte zu einer erhöhten Transformationsrate, allerdings war der Effekt deutlich geringer verglichen mit *comK*. Neben der Induktion von einzelnen Kompetenzfaktoren wurden auch die Kombinationen zweier Faktoren getestet. Dabei wurde *comK* mit *comS*, *comK* mit *dprA* und *comS* mit *dprA* kombiniert. Hierbei ergab die Kombination aus *comK* mit *comS* die höchste Koloniezahl und auch ohne Induktion war bei dieser Kombination bereits eine hohe Aktivierung der Kompetenz gegenüber dem WT zu erkennen.



**Abbildung 18: Auswirkung der Mannitol induzierten Expression verschiedener Kompetenzgene auf die Transformationsrate von *B. subtilis* 168 mit Plasmid DNA.** Die Stämme *B. subtilis* 168 (WT), REG6 ( $P_{mnlA}$ -*comK*), REG3 ( $P_{mnlA}$ -*comS*), REG4 ( $P_{mnlA}$ -*dprA*), REG19 ( $P_{mnlA}$ -*comK-comS*), REG7 ( $P_{mnlA}$ -*comK-dprA*), REG5 ( $P_{mnlA}$ -*comS-dprA*) wurden in LB-Medium mit und ohne Mannitol Zugabe angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Wenn chromosomale DNA als Donor-DNA verwendet wurde (Abbildung 19), zeigte sich im Verhältnis ein ähnliches Ergebnis. Die  $P_{mnlA}$  bedingte *comK* Expression, entweder alleine oder in Kombination mit *comS* oder *dprA*, ergaben die höchsten Koloniezahlen. Im Vergleich zu der Transformation mit Plasmid-DNA zeigten diese Stämme auch ohne Mannitol Zugabe bei der Anzucht eine geringere Transformationsrate. Im Gegen-

satz zur Plasmid-Transformation zeigten die Stämme REG3, REG4 und REG5 keine so deutlich gesteigerte Transformationsrate. Das Wachstum der Stämme wurde während der Anzucht für die Transformation über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) verfolgt (Tabelle 20). Für die Tagkultur wurden die Zellen mit einer  $OD_{600nm}$  von 0,1 angeimpft und inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 % Mannitol zur Kultur nach 1,5 h erfolgte die Induktion.



**Abbildung 19: Auswirkung der Mannitol induzierten Expression verschiedener Kompetenzgene auf die Transformationsrate von *B. subtilis* 168 mit chromosomaler DNA.** Die Stämme *B. subtilis* 168 (WT), REG6 ( $P_{mliA-comK}$ ), REG3 ( $P_{mliA-comS}$ ), REG4 ( $P_{mliA-dprA}$ ), REG19 ( $P_{mliA-comK-comS}$ ), REG7 ( $P_{mliA-comK-dprA}$ ), REG5 ( $P_{mliA-comS-dprA}$ ) wurden in LB-Medium mit und ohne Mannitol Zugabe angezogen und mit 3  $\mu$ g chromosomaler DNA des Stammes KM0 transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Es zeigte sich, dass die Mannitol Zugabe und damit die zusätzliche Expression der entsprechenden Kompetenzfaktoren (Ausnahme WT) unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum haben. Bei dem WT als auch bei den Stämmen REG3, REG4, REG5 und REG7 war ein schnelleres Wachstum zu beobachten, während es sich bei REG6 und REG19 verringerte. Nach dem Waschen wurde 1 ml Kultur mit einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 zusammen mit der Donor-DNA für 1 h gerollert. Auch hier zeigte sich, dass die induzierte Expression der jeweiligen Kompetenzfaktoren Auswirkungen auf das Wachstum hatte. Die Stämme WT, REG3 und REG4 hatten nach dieser Stunde eine deutlich höhere Zelldichte, wenn davor Mannitol zu der Kultur gegeben worden war. Bei REG5 hatte dies keine und bei REG7 nur eine geringe Auswirkung. Dagegen ließ der Wert der

optischen Dichte bei REG6 und REG19 darauf schließen, dass das Wachstum in dieser Zeit stagnierte.

**Tabelle 20: Wachstum der Stämme *B. subtilis* 168 (WT), REG6 ( $P_{mIA-comK}$ ), REG3 ( $P_{mIA-comS}$ ), REG4 ( $P_{mIA-dprA}$ ), REG19 ( $P_{mIA-comK-comS}$ ), REG7 ( $P_{mIA-comK-dprA}$ ), REG5 ( $P_{mIA-comS-dprA}$ ) und REG5 mit und ohne Zugabe von Mannitol während der Anzucht für die Transformation und DNA-Aufnahme.** Das Wachstum der Kulturen wurde mit (Mtl) und ohne Mannitol (/) nach 3 Stunden (TK) sowie nach Verdünnen auf 0,5 OD<sub>600nm</sub> und dem einstündigen Rollern über die optische Dichte bestimmt. Als Referenz diente LB-Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Stamm	WT		REG6		REG3		REG4		REG19		REG7		REG5	
Induktion	Mtl	/	Mtl	/	Mtl	/	Mtl	/	Mtl	/	Mtl	/	Mtl	/
TK	1,7	1,1	0,7	1,4	2,0	1,4	1,6	1,2	1,0	1,0	1,8	1,2	2,4	1,3
Rollern	1,4	1,3	0,6	1,2	1,4	1,3	1,5	1,3	0,5	1,2	1,0	1,1	1,4	1,4

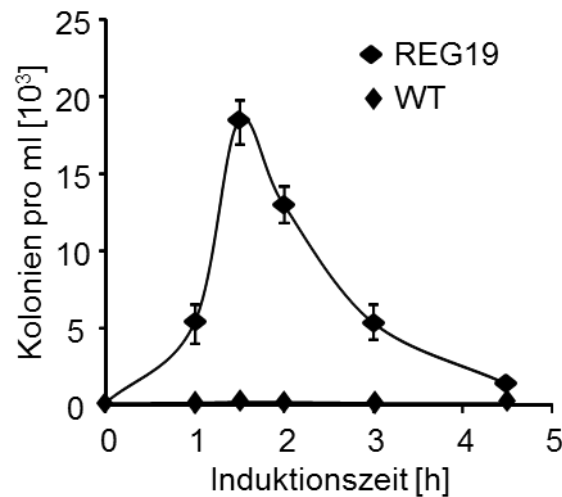
### 3.1.3 Versuche zur Optimierung des Transformationsprotokolls für REG19

Wie bereits festgestellt wurde, ergab die Induktion von *comK* mit *comS* mit Mannitol in REG19 die höchste Transformationsrate im Vergleich zu den anderen Stämmen. Um zu sehen, ob die Zahl an kompetenten Zellen optimiert werden kann, wurden verschiedene Komponenten des Protokolls variiert.

#### 3.1.3.1 Einfluss der Induktionszeit mit Mannitol auf die Transformationsrate

Zunächst wurde die Mannitol-Induktionszeit variiert. Dafür wurden wie bisher Übernachtskulturen des Stammes REG19 und des WT mit frischem LB Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt und 10 ml in 100 ml Schikanekolben bei 37 °C für 1,5 h inkubiert. Anschließend wurde zu den Kulturen 0,5 % (w/v) Mannitol gegeben und diese jeweils für 1 h, 1,5 h, 3 h oder 4,5 h inkubiert. Die induzierten Kulturen wurden anschließend gewaschen, auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,5 verdünnt und zu jeweils 1 ml der Zellen Plasmid-DNA dazu gegeben. Es folgte eine weitere 60 minütige Inkubation bei 37 °C auf dem Roller. Zum Schluss wurden verschiedene Verdünnungen der gerollerten Kulturen auf LB-Agar Platten mit 5 µg/ml Kanamycin ausplattiert und die Transformanten am nächsten Morgen gezählt. Wie die Kurven in Abbildung 20 zeigen, wird

bei dem REG19 Stamm die höchste Transformationsrate nach 1,5 Stunden Induktion erreicht. Eine kürzere bzw. längere Induktion führte zu einer verminderten Transformationsrate.

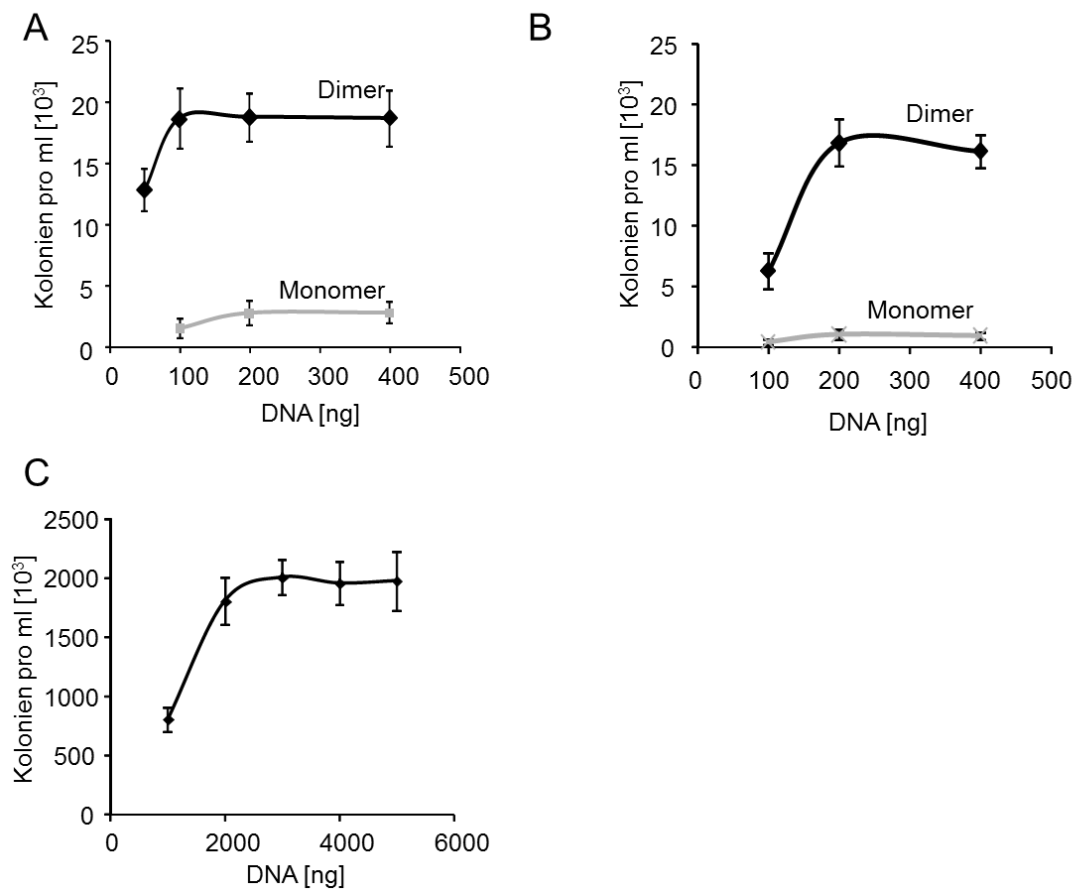


**Abbildung 20: Auswirkung der zeitlich variablen Induktion mit Mannitol auf die Transformationsrate von REG19 und WT.** Die Stämme REG19 und WT wurde für 1,5 h in LB-Medium angezogen und nach Mannitolzugabe unterschiedlich lange induziert (1 h, 1,5 h, 3 h, 4,5 h). Anschließend wurden sie mit 100 ng des Plasmids pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.1.3.2 Abhängigkeit der Transformationsrate von der Menge an zugegebener DNA

Des Weiteren wurde bei der Transformation die Menge der zugegebener DNA variiert. Für die Plasmid-DNA wurden 50 ng, 100 ng, 200 ng und 400 ng des Plasmids pWAL275 in Dimerkonformation sowie 100 ng, 200 ng und 400 ng in Monomerkonformation verwendet (Abbildung 21A). Zudem wurde das Plasmid pJOE4370 verwendet. Es enthält im Vergleich zu pWAL275 keine *mrpS* Region für die Orts-spezifische Rekombination. Dieses Plasmid wurde in den Mengen 100 ng, 200 ng und 400 ng für die Transformation verwendet. Wenn es aus dem Stamm *E. coli* NM538 isoliert worden war, liegt das Plasmid in einem Gemisch aus Plasmiden mit monomerer und multimerer Konformation vor. Wenn das Plasmid aus dem Stamm *E. coli* JM109 isoliert worden war, liegt es in monomerer Konformation vor (Abbildung 21B). Die chromosomale

DNA wurde in den Mengen 1  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 3  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$  und 5  $\mu\text{g}$  verwendet (Abbildung 21C).



**Abbildung 21: Abhängigkeit der Transformationsrate von REG19 von der DNA-Menge.** Der Stamm REG19 wurde (A) mit Plasmid-DNA des Plasmides pWAL275, (B) mit Plasmid-DNA des Plasmides pJOE4370 und (C) mit chromosomaler DNA transformiert. Dabei wurden 50 ng - 400 ng Plasmid-DNA sowohl in Monomer- als auch in Dimerkonformation verwendet sowie 1000 ng - 5000 ng chromosomale DNA. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Die Korrelation zwischen der Transformationsrate und der DNA Menge zeigte eine Sättigung bei  $18,7 \times 10^3$  kanamycinresistenten Kolonien pro 1 ml kompetenter Zellen, wenn der Stamm REG19 mit 100 ng des Plasmides pWAL275 in Dimerkonformation transformiert wurde. 100 ng des Plasmides pWAL275 in Dimerkonformation entsprechen  $8 \times 10^9$  DNA Molekülen. Da eine  $OD_{600}$  von 0,5 einer Zahl von  $2,5 \times 10^8$  Zellen gleich, liegen bei einer maximalen Transformationsrate 32x mehr DNA Moleküle als Zellen vor. Bei dem Plasmid pWAL275 in Monomerkonformation wurde eine Sättigung bei 200 ng DNA erreicht. Dabei wurden  $2,7 \times 10^3$  kanamycinresistente Kolonien pro 1 ml kompetenter Zellen erhalten. 200 ng des Plasmides pWAL275 in Mono-

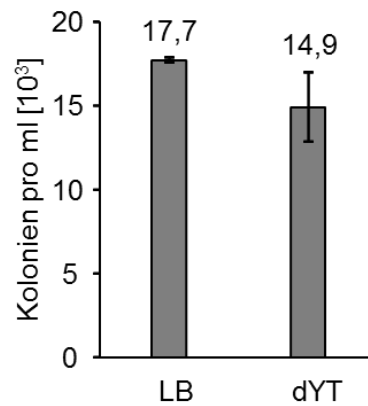
merkonformation entsprechen  $1,6 \times 10^{10}$  DNA Molekülen. Da eine  $OD_{600}$  von 0,5 einer Zahl von  $2,5 \times 10^8$  Zellen gleicht, liegen bei einer maximalen Transformationsrate 64x mehr DNA Moleküle als Zellen vor.

Bei dem Plasmid pJOE4370, isoliert aus den Stämmen *E. coli* NM538 und *E. coli* JM109, wurde dagegen eine Sättigung erreicht, wenn 200 ng transformiert wurden. Dabei wurden  $16,8 \times 10^3$  (*E. coli* NM538) und  $1,0 \times 10^3$  (*E. coli* JM109) kanamycin-resistente Kolonien pro 1 ml kompetenter Zellen erhalten. Weitere Transformationsexperimente wurden mit REG19 und chromosomaler DNA des Stammes *B. subtilis* KM0 durchgeführt. Dabei wurden tryptophanprototrophe Kolonien selektioniert. In diesem Fall zeigte sich eine Sättigung, wenn 3  $\mu$ g chromosomaler DNA zur Transformation eingesetzt wurden. Mit  $2 \times 10^5$  tryptophanprototrophen Kolonien pro ml kompetenter Zellen war die Transformationsrate fast 100-fach höher im Vergleich zur Transformationsrate mit Plasmid-DNA.

### 3.1.3.3 Einfluss des Wachstumsmedium auf die Transformation

Das dYT (double yeast extract + tryptone) Medium zeichnet sich im Vergleich zu LB Medium durch eine doppelte Hefekonzentration aus. Dies könnte einen positiven Effekt auf das Wachstum haben, indem ein schnelleres Wachstum sowie höhere Zelldichten erreicht werden könnten. Um die Wirkung des dYT Mediums im Vergleich zum LB Medium auf die Transformationsrate zu testen, wurde der Stamm REG19 in beiden Medien mit dem Protokoll aus Kapitel 2.3.3.3 angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Die Transformationsrate sowie das Wachstum sind in Abbildung 22 und Tabelle 21 dargestellt. Da die Anzucht in dYT Medium keinen positiven Effekt auf die Transformationsrate hatte, wurde weiterhin LB Medium zur Anzucht verwendet.





**Abbildung 22: Auswirkungen des Wachstumsmediums auf die Transformationsrate von REG19.**

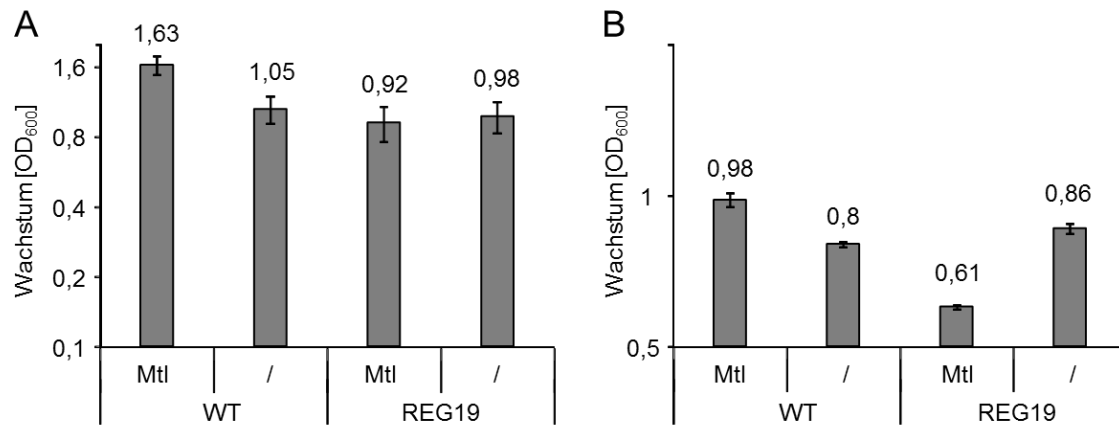
Der Stamm REG19 wurde nach Standardprotokoll in LB- und dYT Medium angezogen, mit Mannitol induziert und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

**Tabelle 21: Auswirkung der Medien auf das Wachstum von REG19 während der Kompetenzentwicklung.** Das Wachstum des Stammes REG19 wurde nach der dreistündigen Anzucht (TK) und nach Verdünnen auf 0,5  $OD_{600nm}$  und dem einstündigen Rollern (Rollern) in LB- und dYT-Medium über die optische Dichte ( $OD=600\text{ nm}$ ) bestimmt. Als Referenz diente die jeweilige Leerkontrolle mit dem entsprechenden Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

REG19	LB	dYT
TK	1,01	1,04
Rollern	0,62	0,67

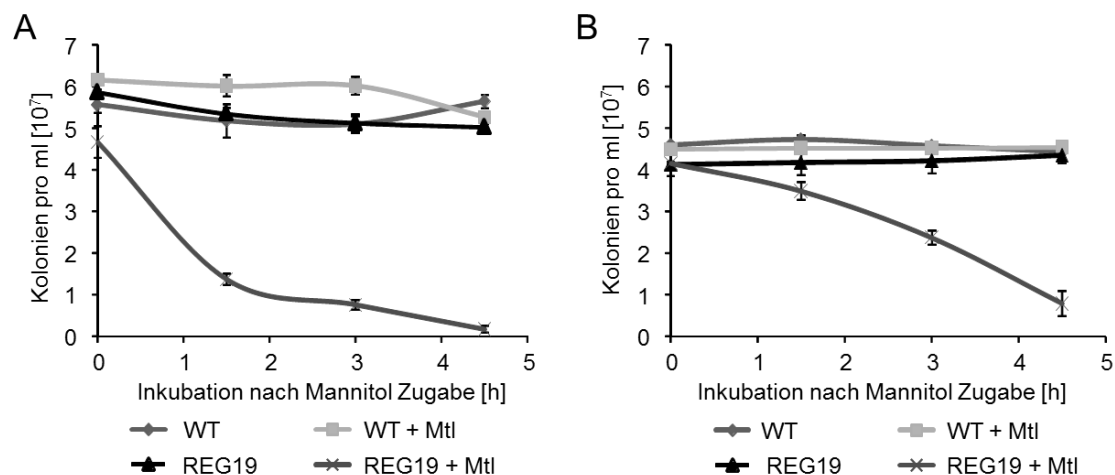
### 3.1.4 Auswirkung der Mannitol Zugabe auf das Wachstumsverhalten von REG19 während der Transformationsversuche

Der Stamm REG19 zeigt bei Transformationsversuchen in LB Medium ein verändertes Wachstum, wenn eine Mannitol Zugabe erfolgt. Um die Wachstumsvarianz exakter bestimmen zu können, wurde der Stamm REG19 mit dem Transformationsprotokoll aus Kapitel 2.3.3.3 angezogen. Das Wachstum wurde über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) nach der dreistündigen TK, als auch nach dem einstündigen Rollern gemessen und ist in Abbildung 23 dargestellt. Als Kontrolle wurde der Stamm *B. subtilis* 168 (WT) verwendet.



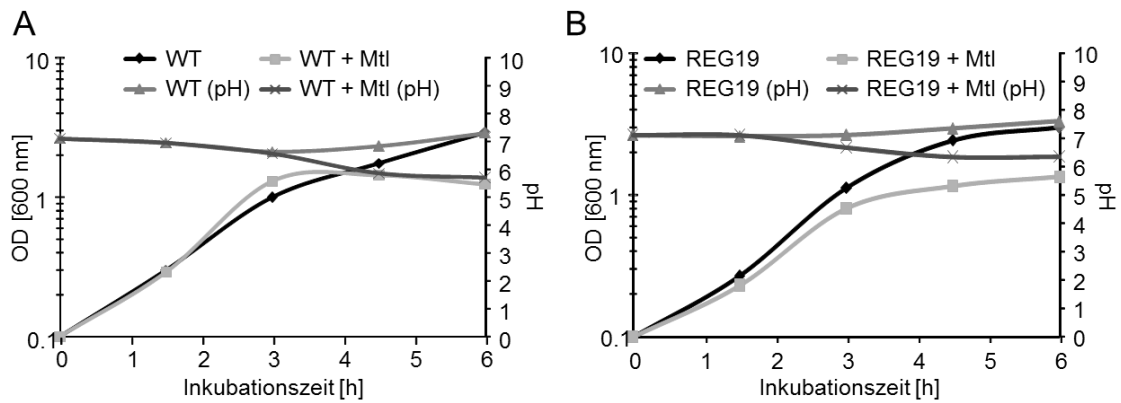
**Abbildung 23: Wachstum des WT Stammes und REG19 während der Anzucht mit und ohne Mannitol Zugabe.** Das Wachstum wurde (A) nach der dreistündigen Anzucht in LB Medium mit und ohne Mannitol Zugabe und (B) nach dem einstündigen Rollern über die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) bestimmt. Als Referenz diente LB-Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Die Reduktion des Wachstums während des Rollerns nach der Mannitol Zugabe ließ vermuten, dass die Lebensfähigkeit bzw. die Fähigkeit zur Koloniebildung verändert waren. Da in dieser Arbeit die Transformationsrate über die Koloniezahl auf der Platte pro Milliliter bestimmt wird, war es notwendig die Lebendzellzahl auf der Platte zu testen. Im Folgenden wurde geprüft, wie viele Zellen der REG19 Kultur eine Kolonie auf Agarplatten ausbilden können im Vergleich zum WT. Die Kultivierung erfolgte mit und ohne Mannitol Zugabe. Dafür wurden die Zellen, ausgehend von einer OD<sub>600</sub> von 0,1 1,5 Stunden angezogen. Danach erfolgte die Mannitol Zugabe mit 0,5 % (w/v) und die Zellen wurden für 1 bis 4,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen ohne DNA-Zugabe in verschiedenen Verdünnungen auf MG-Platten mit Tryptophan und LB-Agar-Platten ohne Antibiotikum ausplattiert. Im Falle der MG-Platten wurden die Kulturen vor dem Ausplattieren abzentrifugiert und in 1% iger NaCl-Lösung resuspendiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend ausgezählt. Das Ergebnis zeigte, dass sowohl auf LB- als auch auf MG-Agar Platten die Koloniezahlen von REG19 mit zunehmender Induktionszeit abnahmen. Dieses Phänomen war ohne Mannitol Zugabe und beim WT nicht zu erkennen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Wirkung der Mannitol Zugabe auf die Koloniezahl von *B. subtilis* 168 (WT) und REG19.** Die Stämme REG19 und *B. subtilis* 168 (WT) wurden in LB-Medium 1,5 h angezogen. Anschließend erfolgte eine 1,5-, 3- und 4,5 stündige Induktion der Kulturen mit 0,5 % (w/v) Mannitol. Die Kulturen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 verdünnt und auf (A) LB-Platten und (B) MG-Platten ausplattiert. Zur Kontrolle dienten Zellen, die ohne Mannitol Zugabe gleich lange inkubiert worden waren.

Der Grund für die Wachstumshemmung und Verminderung der Koloniezahl könnte eine Veränderung des pH-Wertes durch die Mannitol Verwertung sein. Daher wurde der pH-Wert zusammen mit der optischen Dichte während der Kultivierung in LB Medium mit und ohne Mannitol von REG19 und dem WT bestimmt (Abbildung 25). Der WT zeigte kurz nach der Mannitol Zugabe ein schnelleres Wachstum. Nach 4 Stunden war das Wachstum unabhängig von der Mannitol Zugabe identisch und nach 6 Stunden hatte der WT ohne Mannitol Zugabe eine höhere OD erreicht. Der pH-Wert des Mediums nahm mit zunehmender Zeit der Kultivierung mit Mannitol ab, während er ohne Zugabe von Mannitol stabil blieb. Das pH-Wert Verhalten zeigte sich auch mit REG19. Die  $OD_{600}$  Werte zeigten, ein deutlich vermindertes Wachstum an, wenn REG19 mit Mannitol induziert wurde. Eine Stabilisierung des pH-Wertes des Mediums durch Zugabe von 25 mM Natriumphosphat-Puffer führte einerseits zu keiner Veränderung der Transformationsrate, zudem verminderte es das Wachstum (nicht gezeigt).



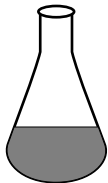
**Abbildung 25: Wirkung der Mannitol Zugabe auf das Wachstum der Zellen und den pH-Wert des Mediums.** Gezeigt ist die Wachstumskinetik des Stammes *B. subtilis* 168 (WT) (A) und REG19 (B) während der Anzucht mit LB-Medium. Nach 1,5 h wurde Mannitol (0,5 %) zugegeben. Aufgetragen sind die Mittelwerte der  $OD_{600}$  und der pH-Wert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung betrug  $< 10\%$ . Als Kontrolle diente die TK ohne Mannitol Zugabe.

### 3.1.5 Transformationsprotokoll für den Stamm REG19

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen wurde ein Protokoll zur Transformation des Stammes REG19 erstellt:



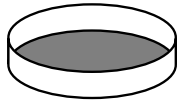
- Animpfen einer 5 ml ÜK in LB Medium mit einer Einzelkolonie
- Verwendung der ÜK mit einer  $OD_{600}$  von 1,2 – 1,7



- Animpfen einer 10 ml TK in LB-Medium in einem 100 ml Schickankolben auf eine  $OD_{600}$  von 0,1
- Inkubation der TK für 1,5 Stunden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler bei 150 rpm
- Zugabe von 0,5 % (w/v) Mannitol zur TK
- Weitere Inkubation der TK für 1,5 Stunden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler bei 150 rpm



- 1 ml der TK mit 4500 rpm abzentrifugieren und in 1 ml LB Medium resuspendieren
- 1 ml der gewaschenen Kultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 verdünnen und mit DNA versetzen
- Das Gemisch aus Kultur und DNA für 1 Stunde bei 37 °C unter Rollern inkubieren



- 50  $\mu$ l – 100  $\mu$ l des Gemisches aus Kultur und DNA verdünnt bzw. nicht verdünnt ausplattieren
- Platten ÜN bei 37 °C inkubieren

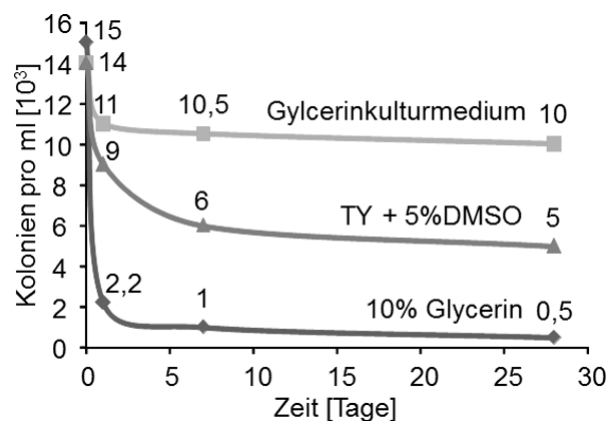
In den weiteren Transformationsexperimenten wurden die Stämme mit pWAL275 (100 ng Dimerkonformation) oder 3  $\mu$ g chromosomaler KMO DNA transformiert. Im Falle von Plasmid-DNA wurden 50-100  $\mu$ l des Gemisches aus der Kultur und der DNA auf LB-Agar Platten mit 5  $\mu$ g/ml Kanamycin ausplattiert. Im Falle der chromosomalen DNA wurde das Gemisch aus der Kultur und der DNA mit 4500 rpm abzentrifugiert und in 1 ml 1 % NaCl aufgenommen. Davon wurden 50  $\mu$ l einer  $10^{-2}$  Verdünnung auf MG Platten ausplattiert.

### 3.1.6 Herstellung und Lagerung kompetenter Zellen

Um das Protokoll der Transformation von REG19 in LB-Medium abzurunden, wurden zudem lagerungsfähige kompetente Kulturen hergestellt. Dabei war es wichtig, ein geeignetes Einfriermedium zu finden, da es durch das Einfrieren zu Zellschädigungen kommen kann. Dies kann z.B. durch die Zugabe von Substanzen wie Glycerin (10-20 % ige Lösung in Wasser) oder DMSO (5-10 % ige Lösung in Wasser) zum Medium vermieden werden (Fuchs *et al.*, 2007). Glycerin und DMSO dienen als Gefrierschutz, indem sie Kristallisationsgeschwindigkeit verändern sowie die Dehydratation des Zytoplasmas verhindern. Für die Herstellung der lagerungsfähigen Kulturen des Stammes REG19 wurden die Zellen wie in Kapitel 2.3.3.3 beschrieben für 3 Stunden inkubiert und dabei mit Mannitol induziert. Anschließend wurde die Menge an Zellen, die einer  $OD_{600}$  von 1,0 entsprechen, abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 9000 rpm, 5 min), in 100  $\mu$ l Einfriermedium aufgenommen und in vorgekühlte 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße gegeben. Die Mikroreaktionsgefäße mit den Zellen wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Als Einfriermedien wurde eine 10 %ige Glycerin-

Wasser Mischung, Glycerinkulturmedium (TY-Medium + Glycerin) sowie TY-Medium mit 5 % DMSO verwendet. Nach 1, 7 und 28 Tagen wurden die in  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten lagerungsfähigen Kulturen auf Eis aufgetaut,  $900\text{ }\mu\text{l}$  LB-Medium dazugegeben und zusammen mit der Donor-DNA (hier: pWAL275 in Dimerkonformation) für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerollert.  $100\text{ }\mu\text{l}$  der Kultur wurden auf LB-Platten mit  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  Kanamycin ausplattiert, die ÜN bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und am nächsten Tag ausgezählt. Tag 0 entspricht dem Tag der Herstellung der kompetenten lagerungsfähigen Zellen ohne Aufnahme in Einfriermedium und Einfrieren. Zum Vergleich wurden auch an diesem Tag die Zellen mit pWAL275 als Donor-DNA transformiert.

Die Abbildung 26 zeigt die Anzahl der Kolonien, die durch die Transformation der lagerungsfähigen Kulturen in den entsprechenden Einfriermedien und in Abhängigkeit von der Lagerungszeit bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  erreicht wurden. Bei jedem Einfriermedium war zu erkennen, dass der Vorgang des Einfrierens eine negative Auswirkung auf die Zahl der Kolonien hatte. Dagegen wirkte sich die Lagerungsdauer bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  nur wenig auf die Anzahl der Kolonien aus. Wenn 10 % Glycerin als Einfriermedium verwendet wurden, sank die Anzahl der Kolonien bereits nach einem Tag um 86,7 %. Wenn TY mit 5 % DMSO verwendet wurde, sank die Anzahl der Kolonien nach einem Tag um 64,3 % und mit Glycerinkulturmedium (TY-Medium+Glycerin) nur um 21,5 %. Mit diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass sich das Glycerinkulturmedium am besten für eine kompetente lagerungsfähige Kultur eignet.



**Abbildung 26: Transformationsrate von REG19 nach Einfrieren bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  in verschiedenen Medien und für unterschiedliche Zeiten.** Gezeigt ist die Zahl der Kolonien nach der Transformation von REG19 Dauerkulturen mit  $100\text{ ng}$  des Plasmids pWAL275 in Dimerkonformation. Als Dauerkulturmedium wurde 10 % Glycerin, Glycerinkulturmedium und TY mit 5 % DMSO ausgetestet und die Zellen 1, 7 und 28 Tage bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. An Tag 0 wurden die Zellen kompetent gemacht und ohne Aufnahme in Einfriermedium und Einfrieren transformiert.

## 3.2 Transformationseffizienz bei der MG- und der LB-Methode

Mit der von Spizizen und Anagnostopoulos im Jahre 1961 entwickelten Transformationsmethode wird nur ein geringer Teil der Zellen in der Kultur kompetent (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Davon wird wiederum nur ein geringer Teil der Zellen erfolgreich transformiert. Die verbesserte Transformationsrate des REG19 Stammes mit der LB-Methode führte zu einigen Fragen. Werden mehr REG19 Zellen mit der LB-Methode kompetent? Oder ist die DNA-Aufnahme bzw. die Rekombination der chromosomalen DNA und Etablierung der Plasmid-DNA erhöht? Welche Parameter sind in den mit Mannitol induzierten REG19 Zellen gegenüber den kompetenten Zellen mit der MG-Methode verändert?

### 3.2.1 Bestimmung der Transformationsrate im Vergleich zur Zellzahl

Um die Transformationsrate über die Zellzahl bestimmen zu können, wurden der Stamm *B. subtilis* 168 in MG-Medium und der Stamm REG19 in LB-Medium angezogen und mit pWAL275 bzw. chromosomaler DNA des Stammes *B. subtilis* KM0 transformiert. Es wurde sowohl die Zahl an Transformanten bestimmt als auch die Gesamtzellzahl. Dafür wurden die Transformationsansätze mit pWAL275 auf LB-Agar Platten ohne Antibiotikum bzw. mit KM0 auf MG-Agar Platten ohne Tryptophan ausplattiert. Die LB-Agar Platten wurden über Nacht und die MG-Agar Platten für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten ausgezählt und darüber die Rate der Zellen, die erfolgreich transformiert wurden, bestimmt.

Dabei zeigte sich (Tabelle 22), dass nur eine sehr geringe Zahl der Zellen transformiert wurde. Bei dem Stamm *B. subtilis* 168, in MG-Medium angezogen und mit pWAL275 transformiert, wurden  $2,5 \times 10^3$  Kolonien bei einer Gesamtzellzahl von  $6 \times 10^7$  Zellen erhalten. Dies bedeutet, dass nur 0,004 % der Zellen in der Lage waren, eine Kolonie auf Platten mit Kanamycin zu bilden. Bei der Transformation mit chromosomaler KM0 DNA wurden  $1,25 \times 10^5$  Kolonien erhalten, womit die Transformationsrate bei 0,18 % lag. Wenn der REG19 Stamm in LB-Medium mit Mannitol Zugabe angezogen wurde, war die Transformationsrate höher. Es entstanden  $1,6 \times 10^4$  Kolonien bei einer Gesamtzellzahl von  $2,1 \times 10^8$ , wenn die Zellen mit pWAL275 in Dimerkonformation transformiert wurden. Somit ergab sich eine Transformationsrate von 0,008 % für pWAL275

in Dimerkonformation. Wenn chromosomale KM0 DNA transformiert wurde, entstanden  $2 \times 10^6$  Kolonien und damit eine Transformationsrate von 1 %.

Sowohl in MG- als auch in LB-Medium waren mehr Zellen in der Lage die chromosomale DNA in das Genom zu integrieren, als das Plasmid zu etablieren. Es zeigte sich aber auch, dass die Anzucht im LB Medium eine höhere Ausbeute an Zellen mit der Fähigkeit zur DNA Aufnahme hervorgerufen hatte. Das Plasmid pWAL275 etablierte sich in knapp doppelt so viele Zellen, im Vergleich zur Anzucht in MG-Medium. Im Falle der chromosomalen DNA war die Zahl fast um das 6-fache gesteigert.

**Tabelle 22: Bestimmung der Transformationsrate des REG19 Stammes nach Anzucht in MG- und LB-Medium.** Die Rate der kompetenten Zellen wurde über die Zahl der gebildeten Kolonien nach der Transformation im Vergleich zur Gesamtzellzahl bestimmt. Dafür wurde der Stamm REG19 sowohl in MG-Medium angezogen und mit der Paris Methode (Kapitel 2.3.3.2) transformiert, als auch in LB-Medium angezogen und mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode transformiert. Als Donor-DNA wurden sowohl 100 ng des Plasmids pWAL275 in Dimerkonformation als auch 3  $\mu$ g chromosomale DNA des Stammes KM0 verwendet.

Transformations- medium	MG-Medium		LB-Medium	
	pWAL275 (Dimer)	KM0 (chrom. DNA)	pWAL275 (Dimer)	KM0 (chrom. DNA)
Kolonien pro ml	$2,5 \times 10^3$	$1,25 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$2 \times 10^6$
Gesamtzellzahl pro ml	$6 \times 10^7$	$7 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$	$2 \times 10^8$
Rate	<b>0,004 %</b>	<b>0,18 %</b>	<b>0,008 %</b>	<b>1 %</b>

### 3.2.2 Bestimmung der Anzahl kompetenter Zellen durch Mikroskopie

Um die Zahl der kompetenten Zellen unabhängig von der DNA-Aufnahmerate und Koloniebildung untersuchen zu können, wurden die kompetenten Zellen durch Mikroskopie bestimmt. Da ComK an den  $P_{comGA}$  Promotor bindet und die Expression darüber aktiviert, wurde das *eGFP* Gen mit einem zusätzlichen  $P_{comGA}$  Promotor gekoppelt und in das Genom eingefügt (siehe unten). Dies führte dazu, dass kompetente Zellen eGFP bildeten und im Mikroskop identifiziert werden konnten.

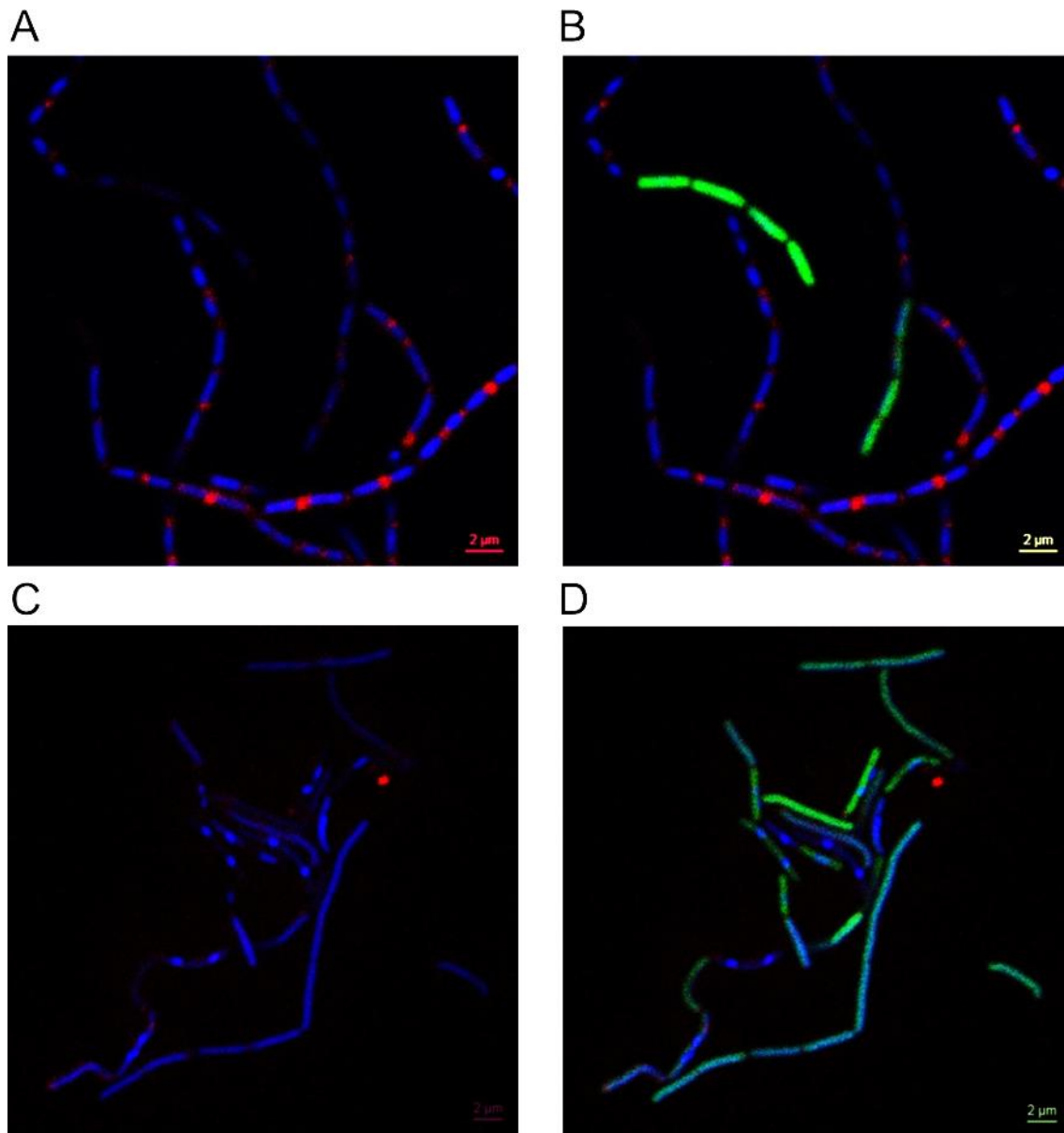
Hierfür wurde der Promotor  $P_{comGA}$  (Oligonukleotide s8435, s8436) und des Gen *eGFP* (Oligonukleotide s8437 / s8438) über eine PCR amplifiziert und über eine Fusions-PCR



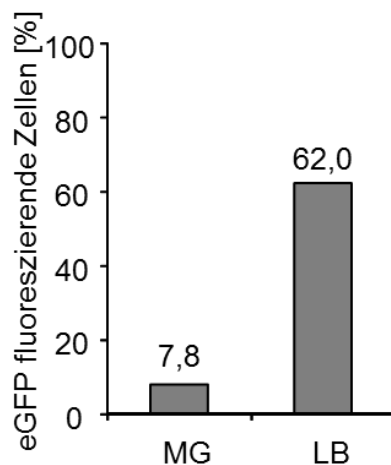
(Oligonukleotide s8435 / s8438) gekoppelt. Zudem wurde die Sequenz zur homologen Rekombination (*yuaB*) aus pJOE7710 über *SphI* Schnittstellen in den Klonierungsvektor pJOE4786 eingebracht (pREG16), wodurch nun die Fusions-PCR über eine *KpnI* Schnittstelle in das Gen *yuaB* eingefügt werden konnte (pREG17). Die Konstruktion *yuaB*'-*P<sub>comGA</sub>*-*eGFP*'-*yuaB* wurde schließlich über eine *SphI* Schnittstelle in pJOE7710 eingefügt (pREG18) und das Plasmid in den Stamm REG19 (REG48) bzw. IIG-Bs168-1 (REG47) integriert. Die Stämme REG47 und REG48 wurden anschließend sowohl mit der MG- als auch der LB-Methode kompetent gemacht. Es wurde vermutet, dass die Zellen fluoreszieren, die den ComK Schwellenwert erreichen und dadurch die DNA-Aufnahmekomplexe ausbilden. Zur genaueren Zellzahlbestimmung wurde die chromosomale DNA mit DAPI markiert und die Membranen mit FM4-64 gefärbt (siehe Kapitel 2.3.4.1). Anschließend wurden die Zellen zwischen einem mit 1 % Agarose beschichtet Objektträger und einem Deckgläschen luftblasenfrei fixiert. Die Lagerung erfolgte gekühlt (4 °C) und im Dunkeln. Um eine gute Membranfärbung zu gewährleisten, wurden die Zellen innerhalb der nächsten Stunden mit einem Konfokalmikroskop mikroskopiert. Das Konfokalmikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop, das im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop das Präparat zu jedem Zeitpunkt nur zu einem kleinen Teil beleuchtet. Dadurch ist eine genauere und detailliertere Bestimmung der kompetenten Zellen möglich. Durch das Abrastern des Präparats kann trotzdem ein vollständiges Bild entstehen. Die Zellen wurden mit dem Laser Scanning Konfokal Mikroskop (LSM710 AxioObserver, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 63-fachen Objektiv (Plan-Apochromat 1,4) mit Ölimmersion (Immersol; Zeiss, Jena, Deutschland) mikroskopiert. Die Anregungswellenlänge des Argonlasers war für DAPI 405 nm, für eGFP 488 nm und 514 nm für FM4-64. Die aufgenommenen Bilder konnten anschließend mit dem Programm ZEN2012 (Zeiss) betrachtet und analysiert werden.

Insgesamt wurden für jeden Stamm 1000 Zellen ausgezählt und die Zahl der Zellen mit einem eGFP Signal bestimmt. In Abbildung 27 sind die Zellen der Stämme REG47 und REG48 ohne als auch mit eGFP Anregung dargestellt. In blau ist die DNA dargestellt (DAPI), in rot die Zellmembranen (FM4-64) und in Grün die Zellen, die eGFP enthalten. Hierbei ist zu erkennen, dass die Zellen des Stammes REG48, die in LB-Medium angezogen wurden, nach der Zellteilung vermehrt zusammenhängen und damit längere Filamente bilden. Die Zellen des Stammes REG47, die in MG-Medium mit der Paris-Methode kompetent gemacht wurden, waren deutlicher voneinander getrennt. Des

Weiteren war zu erkennen, dass bei diesem Stamm deutlich weniger Zellen grün fluoreszieren. Bei jeweils 1000 ausgezählten Zellen zeigte sich, dass gerade einmal 7,8 % der REG47 Zellen fluoreszierend leuchteten, dagegen 62 % der REG48 Zellen (Abbildung 28).



**Abbildung 27: Bestimmung der Anzahl kompetenter Zellen anhand der eGFP Produktion mittels Konfokalmikroskopie.** Der Stamm REG47 wurde in MG-Medium (Paris Methode) und der Stamm REG48 in LB-Medium kompetent gemacht. REG47 (*B. subtilis* 168  $P_{comG}$ -eGFP) wurde mit der MG-Methode angezogen (A, B) und REG48 (REG19  $P_{comG}$ -eGFP) mit der LB-Methode (C, D) zur Kompetenz gebracht. Die DNA der Zellen wurde mit Dapi (blau) und die Zellmembranen mit FM 4-64 (rot) gefärbt. Die Aufnahmen in A und C wurden ohne Anregung und in B und D mit Anregung von eGFP gemacht. Kompetente Zellen fluoreszieren grün (B, D). Es wurden jeweils 1000 Zellen ausgezählt.



**Abbildung 28: Bestimmung der Anzahl an kompetenten Zellen (%) bei REG47 in MG-Medium und REG48 in LB-Medium anhand von eGFP Fluoreszenz.** Es wurden jeweils 1000 Zellen (siehe Legende von Abbildung 27) ausgezählt.

Vergleicht man die Anzahl der Kolonien, die durch die Transformation mit Plasmid- und chromosomaler DNA erhalten wurden, mit der Anzahl der fluoreszierenden Zellen nach der Konfokalmikroskopie, zeigt sich eine deutliche Diskrepanz. Die fluoreszierenden Zellen wurden als kompetente Zellen interpretiert. Im Falle von REG47 fluoreszierten 7,8% der Zellen, aber es wurden nur 0,004 % mit Plasmid-DNA und 0,18 % mit chromosomaler DNA erfolgreich transformiert. Bei REG48 fluoreszierten 62 % der Zellen, aber auch hier wurden nur 0,08 % bzw. 1 % mit Plasmid- bzw. chromosomaler DNA erfolgreich transformiert (vgl. Kapitel 3.2.1, Tabelle 22).

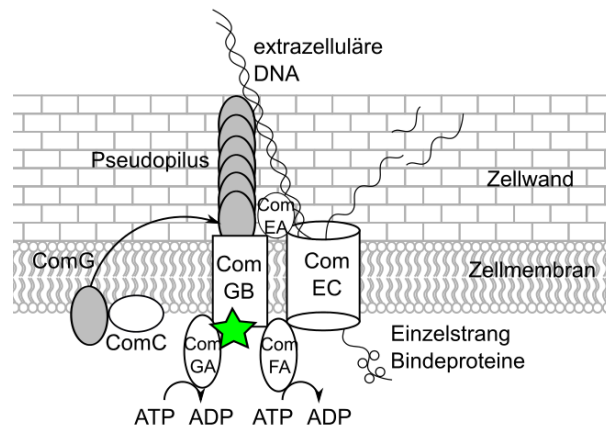
**Tabelle 23: Vergleich der Anzahl fluoreszierender und damit kompetenter Zellen (%) mit der Transformationsrate durch Plasmid (pWAL275 Dimerkonformation) und chromosomaler (KM0) DNA (vgl. Tabelle 22).** Der Stamm REG47 (*B. subtilis* 168  $P_{comG}$ -eGFP) wurde in MG- und der Stamm REG48 (REG19  $P_{comG}$ -eGFP) in LB-Medium angezogen und kompetent gemacht. Zur Transformation wurden 100 ng pWAL275 als auch 3  $\mu$ g chromosomale DNA aus KM0 verwendet. Die Anzahl fluoreszierender Zellen wurde durch Auszählen von jeweils 1000 Zellen bestimmt.

Stamm Transformationsmedium	REG47 MG-Medium		REG48 LB-Medium	
	pWAL275	KM0	pWAL275	KM0
Transformationsrate (vgl. Tabelle 22)	0,004 %	0,18 %	0,008 %	1 %
Fluoreszierende Zellen	7,8 %		62 %	

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die homologe Rekombination bzw. Plasmid-etablierung und die Fähigkeit zur Koloniebildung die Gründe sein könnten, weshalb nur ein geringer Teil der kompetenten Zellen Kolonien auf der Platte bilden können.

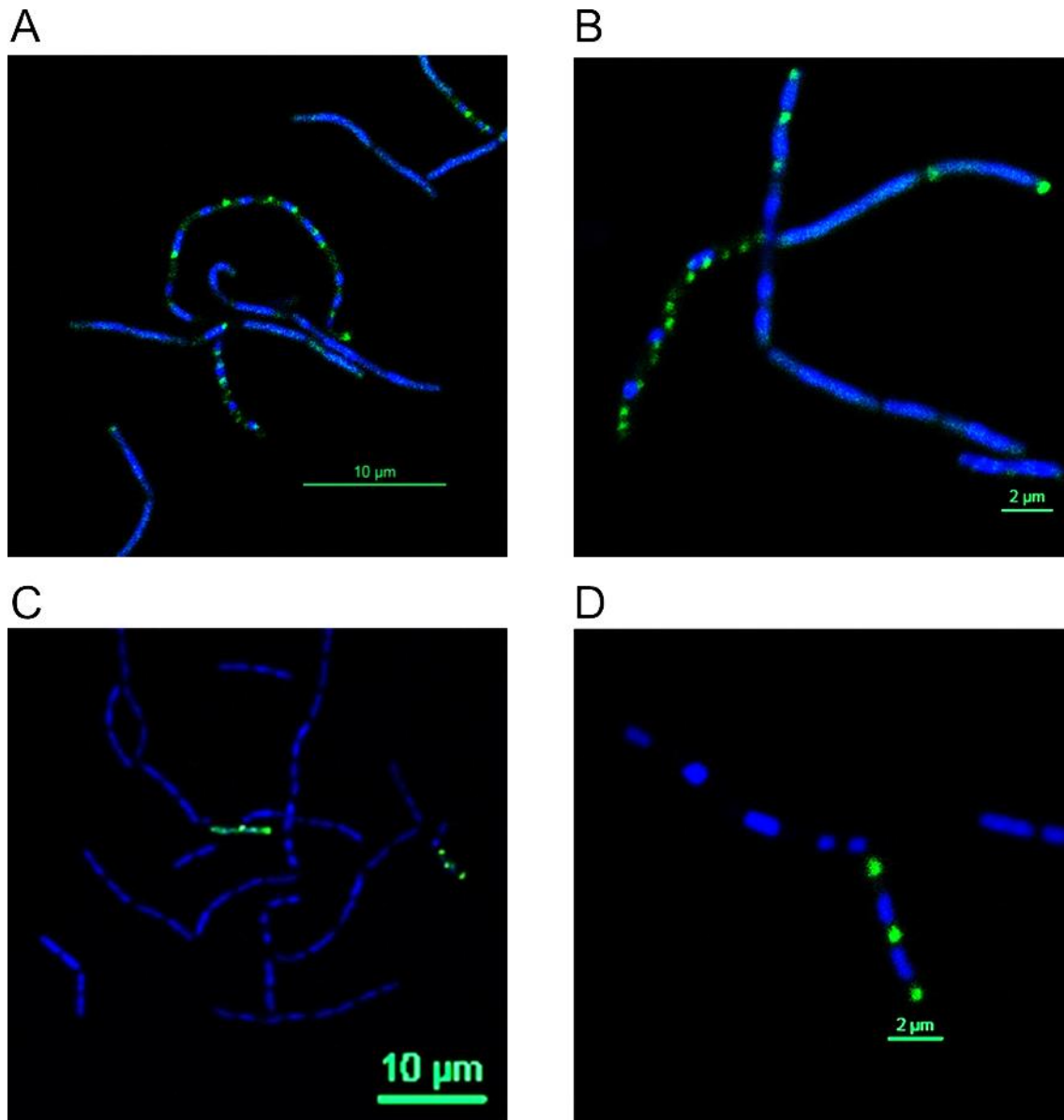
### 3.2.3 Zahl der Zellen mit DNA-Aufnahmekomplexen

Bei der Transformation wird die DNA über DNA-Aufnahmekomplexe in die Zelle transportiert. Die Lokalisation dieser Komplexe konnte bereits von Hahn *et al.* (2005) mit Hilfe des GFP Proteins in den Zellen sichtbar gemacht werden. Offensichtlich bilden sich die DNA-Aufnahmekomplexe nur an den Zellpolen und können entweder nur an einem oder aber an beiden Zellpolen entstehen. Im vorangegangenen Versuch konnte gezeigt werden, dass 62 % der Zellen des Stammes REG19 nach der LB-Transformationsmethode die entsprechende Menge von ComK bilden, um *eGFP* über einen von ComK abhängigen Promotor zu exprimieren. Um nun zu prüfen, in wie vielen Zellen sich an einem oder an beiden Zellpolen DNA-Aufnahmekomplexe ausbilden, wurde das eGFP Protein an das C-terminale Ende von ComGA fusioniert. Dafür wurden zunächst das Gen *comGA* (Oligonukleotide s9193/s9194) ohne ein Stopp-Codon und das Gen *eGFP* (Oligonukleotide s9195/s9196) mit einem Linkermolekül zu *comGA*, ebenso wie das Gen *comGB* (Oligonukleotide s9197/s9198) amplifiziert. Die PCR-Produkte *comGA* und *comGB* wurden mittels einer 3-Fragment-Ligation über die Schnittstellen *SphI* und *EagI* in den Klonierungsvektor pJOE6743 eingefügt (pREG49). Anschließend wurde das PCR Produkt *eGFP* über die Schnittstelle *EagI* zwischen *comGA* und *comGB* in pREG49 integriert (pREG50) und REG19 mit dem Plasmid pREG50 transformiert (REG106).



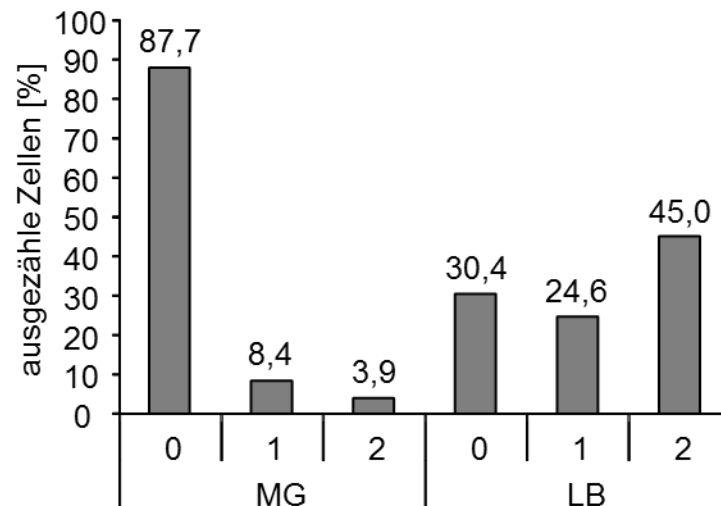
**Abbildung 29: Schematische Darstellung des eGFP markierten DNA-Aufnahmekomplexes in *B. subtilis* (nach Chen & Dubnau, 2004; Claverys *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2004).** Das eGFP Protein (hier dargestellt als Stern) wurde zwischen ComGA und ComGB an das C-terminale Ende von ComGA fusioniert. Mehr Details zum DNA-Aufnahmekomplex sind in Abbildung 4 erläutert.

Der Stamm REG106 wurde sowohl durch die MG- als auch durch die LB-Methode zur Kompetenz gebracht und anschließend mit Dapi gefärbt. Die Zellen wurden dann im Konfokalmikroskop mikroskopiert und, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, ausgezählt. Die Abbildung 30 zeigt, dass die Zellen bei beiden Methoden DNA-Aufnahmekomplexe mit gebundenem GFP synthetisiert haben. Manche Zellen zeigten Fluoreszenz nur an einem Zellpol, manche Zellen an beiden Zellpolen und einige Zellen an keinem der beiden Zellpole. Vergleicht man die beiden Methoden, zeigte sich, dass mit der LB-Methode deutlich mehr Zellen DNA-Aufnahmekomplexe am einen oder an beiden Zellpolen ausbilden. Es wurden 1000 Zellen ausgezählt. Im Fall der MG-Methode zeigten 8,4 % der Zellen Fluoreszenz an einem und 3,9 % der Zellen an beiden Zellpolen. Es ist dabei unklar, ob das fluoreszierende Signal an einem Zellpol auf jeweils einen oder auch auf mehrere DNA-Aufnahmekomplexe zurückzuführen ist. Das fluoreszierende Signal bedeutet an beiden Zellpolen, dass wenigstens zwei DNA-Aufnahmekomplexe in der Zelle vorhanden sind. Zusammengefasst weisen 12,3 % der Zellen des Stammes REG106 nach der Behandlung mit der MG-Methode ein fluoreszierendes Signal auf.



**Abbildung 30:** Übersichts- und Detailaufnahmen der nach der LB- (A, B) und der MG-Methode (C, D) kompetent gemachten REG106 Zellen, deren DNA-Aufnahmekomplexe durch die Fusion von eGFP mit ComGA markiert wurden. REG106 wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Das Bild wurde mit dem Konfokalmikroskop (LSM710 AxioObserver) mit einem 63-fachen Objektiv (Plan-Apochromat 1,4) aufgenommen.

Im Falle der LB Methode zeigten 24,6 % der Zellen ein fluoreszierendes Signal an einem Zellpol und weitere 45,0 % der Zellen an beiden Zellpolen auf. Zusammen bedeutet dies, dass 69,6 % der Zellen mindestens ein fluoreszierendes Signal aufweisen (Abbildung 31). Die Anzahl der durch die ComGA-eGFP-ComGB Fusion bestimmten Zellen liegt in der gleichen Größenordnung wie bei dem Versuch in Kapitel 3.2.2.



**Abbildung 31: Prozentsatz an Zellen von REG106, die nach der MG- bzw. LB-Methode ein fluoreszierendes Signal zeigten.** Sie zeigten entweder an keinem (0), an einem (1) oder an beiden (2) Zellpolen Fluoreszenz und damit die Ausbildung von DNA-Aufnahmekomplexen.

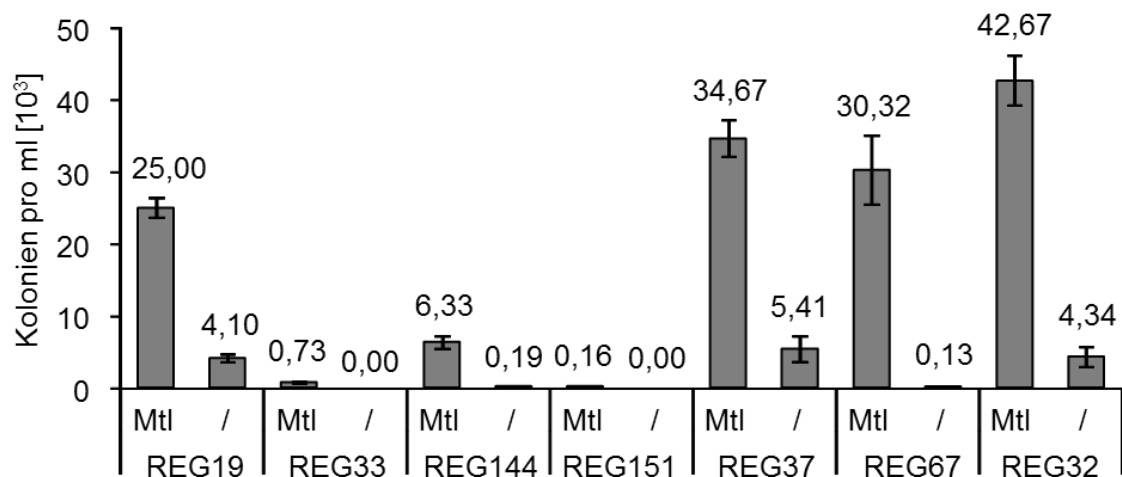
### 3.3 Einfluss von Kompetenzfaktoren auf die Transformation von REG19

#### 3.3.1 Einfluss des natürlichen *comK* Gens auf die Transformation von REG19

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die gemeinsame Induktion von *comK* und *comS* durch Mannitol zu einer hohen Transformationseffizienz bei *B. subtilis* REG19 führt. Um zu verstehen, ob die über  $P_{mIA}$  produzierten Faktoren ComK und ComS, die natürlichen Kompetenz induzierenden Faktoren ersetzen, wurden verschiedene, an der Kompetenzentwicklung beteiligte Gene in REG19 deletiert (*comK*, *comS*, *comQXPA* und *srfA-AD*). Die Deletionen wurden auf verschiedene Weise durchgeführt. Einmal wurde die Deletion mit Hilfe des markerfreien Deletionssystem durchgeführt, das auf dem Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferase System basiert (siehe Material und Methoden). Bei den anderen Deletionen wurde auf BKE-Stämme zurückgegriffen, bei denen das entsprechende Gen durch ein Antibiotika-Resistenzgen ersetzt war. Diese Stämme wurden von der *Bacillus* Stammsammlung zur Verfügung gestellt. Schließlich wurden einzelne Gene deletiert, indem ähnlich wie bei den BKE-Stämmen, flankierende PCR-Fragmente der Zielsequenz mit einem Antibiotika-Resistenzgen über

die Gibson Assembly Methode fusioniert wurden. Dieses Fusionskonstrukt wurde anschließend ohne die Verwendung eines Plasmides in den Stamm REG19 transformiert. Das Gen *comK* wurde deletiert, indem die flankierenden Regionen des Gens über zwei PCR mit den Oligonukleotiden s8132/s8130 und s8131/s8253 amplifiziert und mittels einer Fusions-PCR (s8132, s8253) fusioniert wurden. Das Fusions-PCR Fragment wurde über die *SphI* Schnittstellen in den Klonierungsvektor pJOE6743 integriert (pREG13) und mit pREG13 REG19 transformiert (REG33). Für die Deletion des *comS* Gens wurde REG19 mit chromosomaler DNA des BKE03500 Stammes transformiert (REG131). Um die darüber eingefügte Erythromycinresistenz zu entfernen, wurde der Stamm mit dem instabilen Expressionsvektor pJOE6732.1 transformiert, der das Gen für die P1-Cre-Rekombinase trägt. Das Erythromycin Resistenzgen wurde unter Zurücklassen einer *loxP* Sequenz durch die gebildete Rekombinase wieder aus dem Genom entfernt. Der Vektor pJOE6732.1 ging aufgrund seiner hohen Instabilität wieder verloren (REG144). Die Gene der beiden Operons *comQXPA* und *srfAA-AD* wurden deletiert, indem ca. 700 bp große flankierende Regionen der Operons mittels PCR amplifiziert (*comQXPA*: s8125/s8126 und s8127/ s8128; *srfAA-AD*: s8172/s8173 und s8174/8175) wurden. Die PCR-Produkte zur Deletion von *comQXPA* wurden anschließend mittels einer 3-Fragment-Ligation über die Schnittstellen *SphI* und *BglII* in den Klonierungsvektor pJOE6743 integriert (pREG10). Die PCR-Produkte zur Deletion von *srfAA-AD* wurden ebenfalls mittels einer 3-Fragment-Ligation in den Klonierungsvektor pJOE6743 integriert, jedoch über die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* (pREG12). Mit diesen Plasmiden wurde jeweils der Stamm REG19 transformiert, wobei durch ein Doppelcrossover der flankierenden Genregionen die Deletion der Gene erwirkt wurde (*comQXPA*: REG37; *srfAA-AD*: REG32). Um beide Gene, *comK* und *comS* zu deletieren, wurde REG19.1 mit chromosomaler DNA des BKE10420 Stammes, der eine Deletion des *comK*-Gens aufweist, transformiert (REG151). Für die Deletion der Gene *comQXPA* und *comS* in einem Stamm, wurde der Stamm REG32 ( $\Delta$ *srfAA-AD*) mit dem Plasmid pREG10 ( $\Delta$ *comQXPA*) transformiert (REG67). Alle Stämme wurden über die LB-Methode kompetent gemacht und mit dem Plasmid-Dimer pWAL275 transformiert. Zur Kontrolle wurde auch Mannitol bei der Anzucht weggelassen. Anschließend wurden die kanamycinresistenten Kolonien pro ml Kultur bestimmt und die Anzahl Transformanten sowohl miteinander als auch mit denen des Stammes REG19 verglichen (Abbildung 32).





**Abbildung 32: Vergleich der Transformationsrate von REG19 mit Derivaten, die für die Kompetenzentwicklung wichtige Gene deletiert haben.** Die Stämme REG33 ( $\Delta comK$ ), REG144 ( $\Delta comS$ ), REG151 ( $\Delta comK$ ,  $\Delta comS$ ), REG37 ( $\Delta comQXPA$ ), REG67 ( $\Delta comQXPA$ ,  $\Delta comS$ ), REG32 ( $\Delta srfAA-AD$ ) wurden in LB-Medium (mit und ohne Mannitol Zugabe) zur Kompetenz gebracht und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Die Deletion des nativen *comK* Gens (REG33) führte zu einer signifikanten Abnahme der Transformanten im Vergleich zu dem Stamm REG19. Nach der Induktion durch Mannitol war die Anzahl der Transformanten um den Faktor 34 reduziert, ohne Mannitol Zugabe war dieser Stamm nicht mehr transformierbar. Offensichtlich ist das durch den eigenen Promotor ( $P_{comK}$ ) exprimierte *comK* Gen essentiell für eine effektive Transformation. Die Transformationsrate des Stammes REG144 ( $\Delta comS$ ) war im Vergleich zu der von REG33 ( $\Delta comK$ ) nicht so deutlich vermindert. Für den Stamm REG144 konnten mit pWAL275 in Dimerkonformation 633 Kolonien pro ml nach Mannitol Zugabe und 19 Kolonien pro ml bei nicht induzierter Kompetenz gezählt werden. Damit führte der Verlust des nativen *comS* Gens zu einer 4-fachen Reduktion der Transformationsrate im Vergleich zu REG19. Bei der Deletion der nativen *comK* als auch *comS* Gene zusammen (REG151), war die Transformationsrate im Vergleich zu REG19 um das 156-fache reduziert, dieser Stamm war kaum mehr transformierbar.

Das Zwei-Komponentensystem ComP/ComA mit der Membran-verankerten Sensor Kinase ComP und dem Transkriptionsfaktor ComA (Solomon *et al.*, 1995b) wird mittels Quorum sensing Mechanismus aktiviert. Phosphoryliertes ComA bindet an den Promotor des *srfA*-Operons und induziert dadurch die *srfA* und *comS* Transkription (D'Souza 1994, Hamoen 1995). Da diese Aktivierung eine wichtige Rolle in der Kom-

petenzbildung auf transkriptioneller Ebene spielt, wurden die Gene *comQXPA* in REG19 deletiert (REG37). Überraschenderweise zeigte der Stamm REG37 mit der *comQXPA* Deletion eine 1,4-fach erhöhte Transformationsrate.

Wenn sowohl das Operon *comQXPA* als auch *comS* deletiert waren (REG67), kam es ebenfalls zu einer Steigerung der Transformationsrate im Vergleich zu REG19. Diese 1,2-fache Steigerung bei REG67 war jedoch geringer als die von REG37, der nur das *comQXPA* Operon deletiert hatte. Um diesen Effekt noch weiter zu untersuchen, wurde der Stamm REG32, der das *srfA* Operon, jedoch nicht das *comS* Gen, deletiert hatte, in seiner Transformationsrate charakterisiert. Der Stamm REG32 zeigte im Vergleich zu allen anderen Stämmen die höchste Transformationsrate. Dies lässt darauf schließen, dass die Expression des *srfA* Operons die Transformationsrate negativ beeinflusst.

**Tabelle 24: Wachstum der Stämme REG19 (Kontrolle), REG33 ( $\Delta comK$ ), REG144 ( $\Delta comS$ ), REG151 ( $\Delta comK$ ,  $\Delta comS$ ), REG37 ( $\Delta comQXPA$ ), REG67 ( $\Delta comQXPA$ ,  $\Delta comS$ ) und REG32 ( $\Delta srfAA-AD$ ) bei der Ausbildung der Kompetenz.** Das Wachstum der Stämme wurde nach der dreistündigen Anzucht in LB-Medium mit und ohne Mannitol (TK) und nach dem einstündigen Rollern (Rollern) über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) bestimmt. Als Referenz diente LB-Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

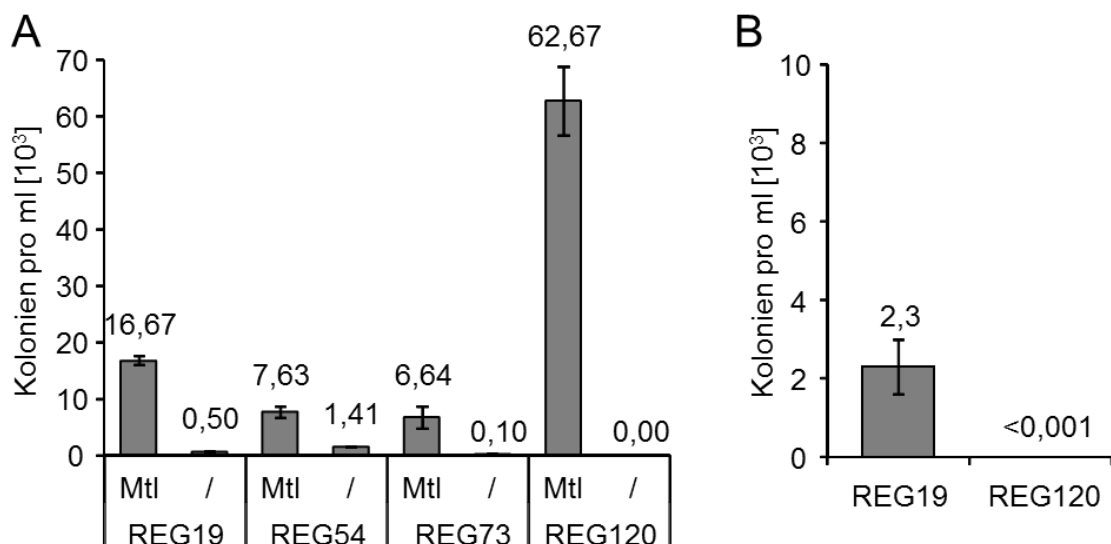
Stamm	REG19	REG33	REG144	REG151	REG37	REG67	REG32
Induktion	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /
TK	1,43 1,57	1,73 1,64	1,49 1,67	2,05 1,8	1,06 1,37	0,68 1,01	0,85 1,14
Rollern	0,69 1,71	1,16 1,76	0,67 1,66	1,43 1,76	0,66 1,39	0,71 1,11	0,63 1,16

Wie in den vorangegangenen Experimenten, wurde auch hier das Wachstum während der Kultivierung und Transformation über die optische Dichte bestimmt. Das Wachstum verbesserte sich, wenn das native *comK* deletiert war (Tabelle 24). Bei REG19 war das Wachstum in der Rollkultur inhibiert, wenn die Kompetenz während der Kultivierung durch Mannitol induziert wurde ( $OD_{600nm}$ : 0,69). Bei der Deletion des nativen *comK*, alleine oder insbesondere zusammen mit *comS*, war dies jedoch nicht der Fall. Diese beiden Deletionsmutanten zeigten keine ( $\Delta comK$ ,  $\Delta comS$ ,  $OD_{600nm}$ : 1,43) oder nur geringe Wachstumshemmungen ( $\Delta comK$ ,  $OD_{600nm}$ : 1,16) während der Phase des Rollerns.

### 3.3.2 Auswirkungen der Deletion von Genen in REG19, die die *comK* Transkription regulieren

Die natürliche *comK* Expression wird auf transkriptioneller Ebene von den Faktoren ComK, AbrB, CodY, Rok, Spo0A und DegU beeinflusst, indem sie an die *comK* Promotor Region binden und sowohl die ComK Bindung als auch die Genexpression beeinflussen. In REG19 scheint das native ComK selbst essentiell für seine eigene Expression zu sein. Sowohl der „Transition Phase“ Regulator AbrB, als auch CodY binden an den *comK* Promotor und besetzen dadurch die RNA Polymerase Bindungsstelle, wodurch die Expression gehemmt ist. Rok hemmt ebenfalls die *comK* Transkription, jedoch ist die genaue Bindestelle unbekannt. Man hat eine ca. 100bp große Region am *comK* Promotor identifiziert, mit der Rok interagiert und dadurch die Bindung von ComK an seinen Promotor unterbindet. Spo0A bindet im Promotorbereich an verschiedene Stellen und kann, je nach Menge, positiv, aber auch negativ auf die *comK* Expression wirken. DegU, der Antwortregulator des Zwei-Komponentensystems aus DegS/DegU, wirkt im dephosphorylierten Zustand positiv auf die Kompetenz. Es erleichtert die Bindung der ComK-Tetramere an die AT-reichen Sequenzen (AT-Boxen) im *comK* Promotor. Im phosphorylierten Zustand wirkt DegU dagegen als Regulator an anderen Promotoren und beeinflusst die Expression von knapp 4 % aller Gene im Genom. Abhängig von der Konzentration kann es die Sekretion von Proteasen und anderen extrazellulären Enzymen, die Biofilmbildung und die Motilität der Zelle aktivieren. Die Einleitung dieser Prozesse wirken sich negativ auf die Kompetenz aus. Für die Deletionen der Gene *abrB*, *rok* und *degU* in REG19 wurden jeweils ca. 700 bp große flankierende Regionen der Gene mittels PCR (*abrB*: Oligonukleotide s8600, s8601 und Oligonukleotide s8602, s8603; *rok*: Oligonukleotide s8809, s8810 und Oligonukleotide s8811, s8812; *degU*: Oligonukleotide s9314, s9315 und Oligonukleotide s9316, s9317) amplifiziert und anschließend mittels einer 3-Fragment Ligation die Amplifikate in das Plasmid pJOE6743 eingefügt. Für pREG21 (*abrB*) wurden die Schnittstellen *HindIII* und *EcoRI* verwendet, für pREG38 (*rok*) und pREG58 (*degU*) *SphI* und *EcoRI*. Mit diesen Plasmiden wurde dann der Stamm REG19 transformiert und über ein Doppelcrossover der flankierenden Regionen die entsprechenden Gene deletiert (*abrB*: REG54; *rok*: REG73; *degU*: REG120). Da AbrB und Rok laut Literatur hemmend auf die *comK* Transkription wirken, wurde davon ausgegangen, dass die Deletionen dieser Gene zu einer Verbesserung der Transformationseffizienz führen. Überraschenderweise kam es jedoch im Falle der *abrB* und *rok* Deletion in REG19 zu einer deutlichen Ver-

schlechterung im Vergleich zu REG19. Wenn REG54 ( $\Delta abrB$ ), induziert mit Mannitol, mit pWAL275 in Dimerkonformation transformiert wurde, erhielt man nur noch 7630 Kolonien und bei REG73 ( $\Delta rok$ ) 6.640 Kolonien pro Milliliter Kultur. Im Vergleich dazu wurden mit REG19 und gleichen Bedingungen 16670 Kolonien erhalten (Abbildung 33A). Ein deutlich anderes Ergebnis zeigte sich bei der Transformation des Stammes REG120 ( $\Delta degU$ ). Diese Deletion führte mit 62670 Kolonien pro Milliliter Kultur zu einer 3,7-fachen Steigerung der Transformationseffizienz im Vergleich zu REG19 (Abbildung 33A). Zur Kontrolle wurde REG120 sowie REG19 zusätzlich in MG-Medium angezogen und mit pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Wie in der Literatur beschrieben, war REG120 bei Anzucht in MG-Medium nicht mehr transformierbar (Abbildung 33B).



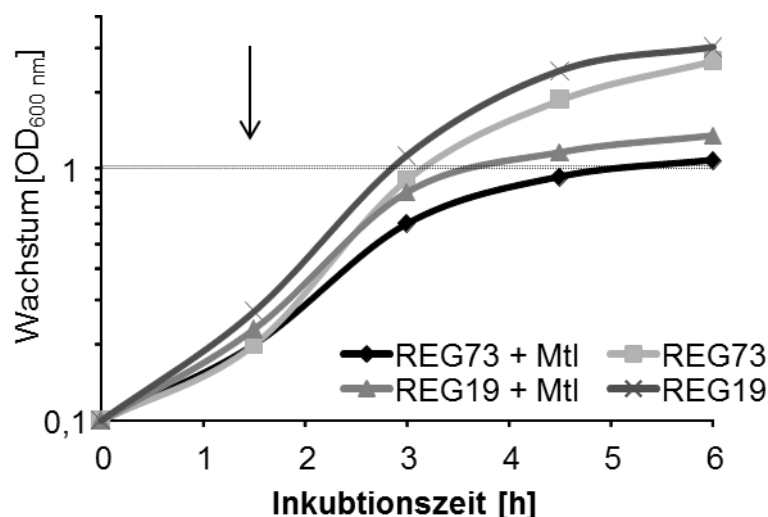
**Abbildung 33: Bestimmung der Transformanten pro ml Kultur in Mutanten, die in der Regulation von *comK* betroffen sind.** (A) Die Stämme REG54 ( $\Delta abrB$ ), REG73 ( $\Delta rok$ ), REG120 ( $\Delta degU$ ) wurden in LB-Medium (mit und ohne Mannitol Zugabe) angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. (B) Hier wurden die Stämme REG19 und REG120 ( $\Delta degU$ ) in MG-Medium zur Kompetenz gebracht und mit pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Das Wachstumsverhalten veränderte sich durch die Deletion des *degU* Genes gegenüber dem Ausgangsstamm REG19 nicht. Dagegen wurde durch die *abrB* Deletion das Wachstum während der Transformation (Inkubation auf dem Roller) kaum mehr gehemmt, wobei die *rok* Deletion zu einer generellen Wachstumsverminderung auch ohne Mannitol Zugabe führte (Tabelle 25).

**Tabelle 25: Wachstum der Stämme REG19, REG54 ( $\Delta abrB$ ), REG73 ( $\Delta rok$ ), REG120 ( $\Delta degU$ ) während der Ausbildung der Kompetenz und der Transformation.** Das Wachstum der Stämme wurde nach der dreistündigen Anzucht in LB-Medium mit und ohne Mannitol (TK) und nach dem einstündigen Rollern (Rollern) über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) bestimmt. Als Referenz diente LB-Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Stamm	REG19	REG54	REG73	REG120
Induktion	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /
TK	1,00 1,26	1,30 1,38	0,69 1,00	1,15 1,33
Rollern	0,85 1,23	1,13 1,4	0,61 1,00	0,82 1,33

Dieses verminderte Wachstum wurde zusätzlich mittels einer Wachstumskurve genauer untersucht (Abbildung 34), wobei festzustellen war, dass neben dem langsameren Wachstum auch eine geringere Zelldichte erreicht wurde.



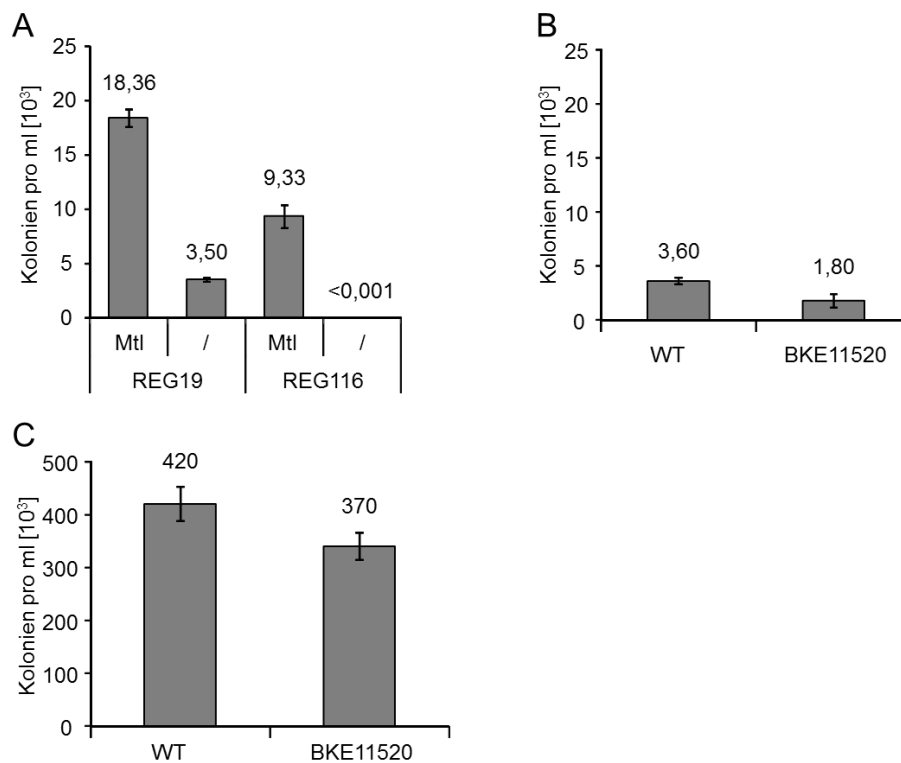
**Abbildung 34: Einfluss der *rok* Deletion in REG19 (REG73) auf das Wachstum.** Wachstumskinetik von REG19 und REG73 mit und ohne Mannitol Zugabe nach 1,5 h Inkubation (Pfeil) bei 37 °C. Aufgetragen sind die Mittelwerte der  $OD_{600}$  aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.3.3 Posttranskriptionelle Regulation von ComK: Auswirkungen der Deletion von *mecA* auf die Transformationseffizienz von REG19

Vermutlich ist die ComK Proteinmenge mehrfach reguliert, um eine vorzeitige Kompetenzentwicklung in der exponentiellen Wachstumsphase zu vermeiden. Neben der transkriptionellen Regulation spielt die posttranskriptionelle Regulation eine wichtige Rolle. Dabei wird ComK von einem Proteinkomplex aus MecA, ClpC und ClpP gebunden und

degradiert. Dies kann verhindert werden, indem die Bindungsstelle von MecA durch ComS blockiert wird (Abbildung 6). Um zu prüfen, inwieweit diese Regulation in Verbindung mit der Mannitol induzierten *comK* und *comS* Expression eine Auswirkung auf die Transformationsrate hat, wurden das Gen *mecA* in REG19 deletiert. Dafür wurde der stromaufwärts und –abwärts liegende Teil des Gens durch PCR amplifiziert (Oligonukleotide s8785, s8786 und s8787, s8788). Die PCR-Amplifikate wurden über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eag*I mittels einer 3-Fragment Ligation in das Plasmid pJOE6743 integriert (pREG29). Über die *Eag*I Schnittstelle zwischen den beiden PCR-Fragmenten wurde ein Chloramphenicol Resistenzgen (Oligonukleotide s9092, s9093) eingefügt (pREG45). Mit diesem Plasmid wurde anschließend REG19 transformiert und dadurch das *mecA* Gen durch das Chloramphenicol Gen ersetzt (REG116). Die Transformationsrate von REG116 wurde mit der von REG19 verglichen.

Es bestand der Verdacht, dass auf Grund des veränderten ComK Abbaus in der Zelle, eine erhöhte Transformationsrate bei REG116 erwartet werden könnte. Eine Steigerung der Effizienz im Vergleich zu REG19 konnte jedoch nicht beobachtet werden, so halbierte sich die Transformationsrate selbst mit Induktion von Mannitol. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass MecA auch an der Regulation anderer wichtiger Proteine involviert ist (Proteine des Zellzyklus) und es durch die Mutation zu einer Beeinträchtigung der Zellen kommt. So war zu beobachten, dass *mecA* deletierte REG19 Zellen bei der Kultivierung schlechter wuchsen (Tabelle 26) und auf Agarplatten sehr kleine Kolonien bildeten. Dieser Phänotyp konnte nach einer Deletion des *mecA* Gens bereits von Hahn *et al.* (1995) gezeigt werden. Interessanterweise gab es die für REG19 typische Wachstumsstagnation nach der DNA Zugabe während des Rollerns nicht. Zur Kontrolle und Überprüfung der in der Literatur gezeigten Ergebnisse (Hahn *et al.*, 1995), wurden ein  $\Delta$ *mecA* Stamm (BKE11520 aus dem Bacillus Genetic Stock Center) sowie REG1 als WT-Kontrolle in MG-Medium angezogen und mit pWAL275 in Dimerkonformation sowie chromosomaler KM0 DNA transformiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 35 B und Abbildung 35 C dargestellt. Überraschenderweise und gegensätzlich zur oben genannten Literatur war auch bei diesen Ergebnissen keine Verbesserung der Transformationseffizienz im Vergleich zum WT zu erkennen.



**Abbildung 35: Auswirkung der *mecA* Deletion auf die Zahl der Transformanten.** (A) REG19 und REG116 ( $\Delta mecA$ ) wurden nach der LB-Methode (zur Kontrolle ohne Mannitol Zugabe) kompetent gemacht und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. (B) und (C) zeigen die Transformationsraten von WT (REG1) und BKE11520 ( $\Delta mecA$ ) bei Verwendung von Plasmid- und chromosomaler DNA. Dafür wurden die Stämme WT (REG1) und BKE11520 (*B. subtilis* 168 *mecA::erm*) nach der MG-Methode kompetent gemacht und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation (B) sowie mit 3  $\mu$ g chromosomaler DNA des KM0 Stammes (C) transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

**Tabelle 26: Auswirkung der *mecA* Deletion bei REG116 auf das Wachstum.** Das Wachstum der Stämme REG19 und REG116 ( $\Delta mecA$ ) wurde nach der dreistündigen Anzucht in LB-Medium mit und ohne Mannitol (TK) und nach dem einstündigen Rollern (Rollern) über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) bestimmt. Als Referenz diente LB-Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Stamm	REG19		REG116	
Induktion	Mtl	/	Mtl	/
TK	1,0	1,26	0,75	1,02
Rollern	0,85	1,23	1,03	1,17

### 3.3.4 Auswirkungen der Deletionen von Genen, die in dem Phosphorelay System zur Differenzierung von *B. subtilis* involviert sind, auf die Transformationsrate von REG19

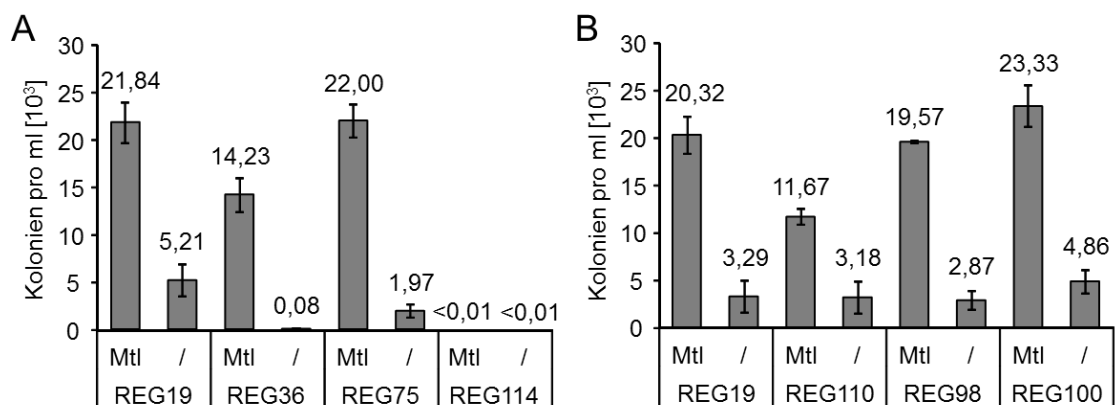
Ein weiterer wichtiger Faktor für die Kompetenz in *B. subtilis* 168 ist das Protein Spo0A, das auch für andere Differenzierungswege und insbesondere für die Initiation der Sporulation verantwortlich ist (Albano *et al.*, 1987; Sadaie & Kada, 1983). Spo0A reduziert die intrazelluläre Menge an AbrB, dem sogenannten „Transition Phase“ Regulator, wodurch die Repression der *comK* Transkription durch AbrB entfällt. Mirouze *et al.* (2012) konnten weiter zeigen, dass neben der Reduzierung von AbrB eine geringe Menge Spo0A~P notwendig ist, um die *comK* Expression zu induzieren. Um den Einfluss von Spo0A und weiteren Faktoren, die für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortlich sind (Histidin Kinasen KinB und KinC sowie die Phosphotransferase Spo0B), auf die mit Mannitol induzierte Kompetenz in REG19 zu untersuchen, wurden die entsprechenden Gene deletiert. Weiterhin wurde das Gen *ftsH* deletiert. FtsH ist eine ATP abhängige Metalloprotease und degradiert unter anderem Spo0E, das wiederum Spo0A dephosphoryliert. Mutanten mit der Deletion von *ftsH* sind in der Sporulation und Biofilmbildung stark eingeschränkt.

Für die Deletionen der Gene wurden zunächst ca. 700 bp große Abschnitte stromaufwärts und -abwärts der Gene amplifiziert (*spo0A/spoIVB*: Oligonukleotide s7328, s7329 und s7330, s7331, *spo0B*: s8649, s8650 und s8651, s8652, *ftsH*: Oligonukleotide: s9351, s9352 und s9353, s9354, *kinB*: Oligonukleotide: s9322, s9323 und s9324, s9325, *kinC*: Oligonukleotide: s9058, s9059 und s9060, s9061) und in das Plasmid pJOE6743 integriert. Für pJOE7122 (*spo0A*, das zusammen mit dem im Operon liegenden Gen *spoIVB* deletiert wurde) wurden die Amplifikate *blunt end* über die Schnittstelle *SmaI* eingefügt, für pJOE8086.1 (*spo0B*) über *BamHI*, sowie für die Plasmide pREG72 (*ftsH*), pREG62 (*kinB*) und pREG43 (*kinC*) wurden die Amplifikate mit *SphI* und *EcoRI* geschnitten und über eine 3-Fragment Ligation integriert. Mit diesen Plasmiden wurde REG19 transformiert und durch Integration sowie anschließende Selektion der Exzision der Plasmide, wie in Material und Methoden (Kapitel 2.4.12) beschrieben, die Gene deletiert (*spo0A/spoIVB*: REG36, *spo0B*: REG75, *ftsH*: REG114, *kinB*: REG110, *kinC*: REG98). Für die gleichzeitige Deletion *kinC* und *spo0B* wurde REG75 mit pREG43 transformiert und die Doppelmutante mit dem gleichen Verfahren isoliert (REG100).



Anschließend wurden die Stämme nach der LB-Methode mit pWAL275 in Dimerkonformation transformiert.

Interessanterweise hatten die Deletionen von *spo0B*, *kinC* und auch die Doppeldeletion von *spo0B/kinC* keinen Einfluss auf die Transformationsrate der REG19 Derivate. Die Deletion von *spo0A/spoIVB* führte zu einer Reduzierung der Transformationsrate von ca. 35 % und die von *kinB* um ca. 50 %. Lediglich die Deletion von *ftsH* zeigte einen sehr drastischen Effekt. Mit diesem Stamm wurden überhaupt keine Kolonien erhalten (Abbildung 36). In den Fällen, in denen die Transformationsrate nicht beeinflusst war, war ein identisches Wachstumsprofil wie für den Stamm REG19 zu beobachten. In der Mutante REG36 ( $\Delta spo0A/spoIVB$ ) war dagegen kaum eine Wachstumshemmung, wie in dem Stamm REG19, erkennbar. Die Mutante REG114 ( $\Delta ftsH$ ) zeigte mit und ohne Induktion ein geringes Wachstum und die Kulturen blieben in allen Versuchen unter einer OD<sub>600</sub> von 1 (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 36: Einfluss der Gene *spo0A*, *spo0B*, *ftsH*, *kinB* und *kinC* auf die durch die LB-Methode erzielte Transformationsrate.** Die Stämme REG36 ( $\Delta spo0A/spoIVB$ ), REG75 ( $\Delta spo0B$ ), REG114 ( $\Delta ftsH$ ) (A) und die Stämme REG110 ( $\Delta kinB$ ), REG98 ( $\Delta kinC$ ) und REG100 ( $\Delta kinC, \Delta spo0B$ ) (B) wurden entsprechend der LB-Methode kompetent gemacht und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Zum Vergleich wurde die Mannitol Zugabe weggelassen. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

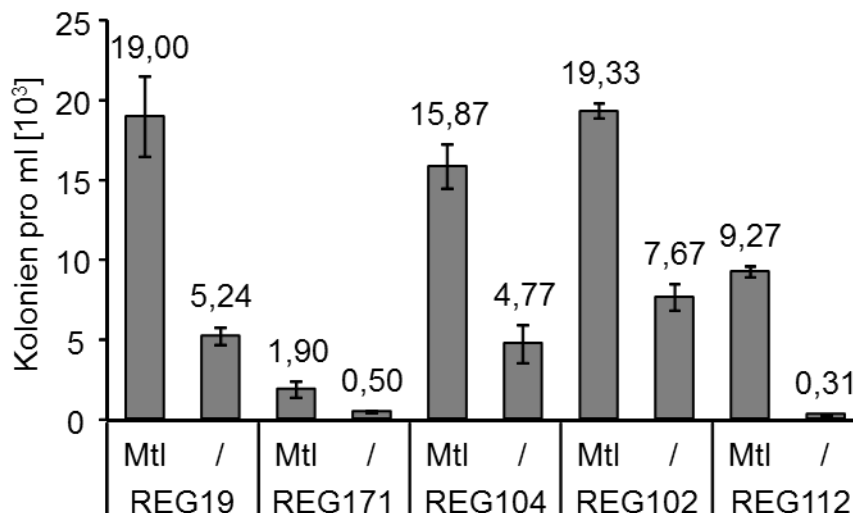
### 3.3.5 Auswirkung der Deletionen von Genen für Antwortregulator Aspartat Phosphatasen auf die Transformationsrate von REG19

In *B. subtilis* gibt es 11 homologe *rap/phr* Gene. Die entsprechenden RAP-Proteine besitzen die Eigenschaft von sogenannten „response regulator“ Aspartat Phosphatasen.

RapA, -E und -H dephosphorylieren Spo0F~P, wodurch sie negativ auf die Sporulation und andere Differenzierungsprozesse während der vegetativen Wachstumsphase wirken (Smits *et al.*, 2007a; Jian *et al.*, 2000; Perego *et al.*, 1994). RapC, -F und -H hemmen die Bindungsaktivität von ComA an die DNA, womit sie spezifisch die Kompetenzentwicklung unterdrücken (Bongiorni *et al.*, 2005; Core & Perego, 2003; Smits *et al.*, 2007b; Smits *et al.*, 2007a; Tortosa & Dubnau, 1999). RapG wiederum hemmt die DNA-Bindungsaktivität von DegU~P (Ogura *et al.*, 2003). Die Aktivität der RAP-Proteine ist abhängig von kleinen, für das RAP-Protein jeweils spezifischen Peptiden (Phr), die an den 3' Enden der jeweiligen *rap* Gene kodiert sind und in der Regel durch Sigmafaktor H abhängige Promotoren am Ende der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert werden und dann die Aktivität der RAP-Proteine hemmen (Perego, 1997).

Um zu sehen, wie sich der Verlust der RAP-Proteine auf die Kompetenz von REG19 auswirkt, wurden vier *rap* Gene und die dazugehörigen *phr* Gene (*rapA/phrA*, *rapC/phrC*, *rapH/phrH*, *rapG/phrG*) in REG19 deletiert. Dafür wurden ca. 700 bp große flankierende Regionen der Gene mittels PCR amplifiziert (*rapC/phrC*: Oligonukleotide: s9226/s9227, s9228/s9229; *rapH*: Oligonukleotide: s9222/s9223, s9224/s9225 und *rapG/phrG*: Oligonukleotide: s9347/s9348, s9349/s9350) und in das Plasmid pJOE6743 über eine 3-Fragment Ligation eingefügt. Als Schnittstellen wurden für die Plasmide pREG56 (*rapC/phrC*) und pREG54 (*rapH/phrH*) *SphI* und *EagI* verwendet, während für das Plasmid pREG70 (*rapG/phrG*) die Schnittstellen *BamHI* und *EagI* genutzt wurden. Mit diesen Plasmiden wurde REG19 transformiert und nach der üblichen Prozedur von Selektion und Gegenselektion behandelt. Schließlich wurde die entsprechende Mutante mittels Kolonie-PCR identifiziert (*rapC/phrC*: REG104; *rapH/phrH*: REG102 und *rapG/phrG*: REG112) (siehe Material und Methoden; Kapitel 2.4.12). Die Gene *rapA* und *phrA* wurden mittels Gibson Assembly deletiert. Dafür wurden drei Fragmente durch PCR amplifiziert (Oligonukleotide: s10684/s10685; s10686/s10687, s10688/s10689). Das erste und dritte Fragment enthielt die stromaufwärts bzw. stromabwärts von *rapA* und *phrA* gelegenen Bereiche. Das zweite Fragment enthielt das Chloramphenicol Resistenzgen mit jeweils einer *loxP* Sequenz in den flankierenden Bereichen. Diese drei Fragmente wurden über Gibson Assembly miteinander ligiert (Gibson5), damit REG19 transformiert und die Integration des Fragments durch ein Doppelcrossover über die Chloramphenicolresistenz selektioniert (REG170). Anschließend wurde REG170 mit pJOE6732 transformiert, wodurch die Chloramphenicol Resistenzkassette mit der in pJOE6732 kodierten P1-Cre-Rekombinase über die flankieren-

den *loxP* Bereiche ausgeschnitten wurde (REG171). Die Stämme wurden ebenso wie der Stamm REG19 mit der LB-Methode behandelt und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Zur Kontrolle wurden die Stämme zusätzlich nicht mit Mannitol induziert (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Vergleich der Transformationsraten von REG19 und Stämmen, in denen verschiedene Antwortregulator Aspartat Phosphatasen deletiert waren.** Die Stämme REG171 ( $\Delta rapA/phrA$ ), REG104 ( $\Delta rapC/phrC$ ), REG102 ( $\Delta rapH/phrH$ ) und REG112 ( $\Delta rapG/phrG$ ) wurden in LB-Medium (mit und ohne Mannitol Zugabe) angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Da RapA Spo0F~P dephosphoryliert, sollte die Deletion des Gens einen negativen Effekt auf die Kompetenz haben. Denn als Folge führt die Erhöhung der Spo0F~P Menge zu einer höheren Menge an Spo0A~P und damit zu einer in Richtung der Sporulation gerichteten Zelldifferenzierung. Dies ließ sich über die Transformationsrate des Stammes REG171 im Vergleich zu REG19 zeigen (Abbildung 37). Die Zahl der Transformanten von REG171 sank auf  $1,9 \times 10^3$  Kolonien pro ml Kultur, das gerade einmal 10 % der Transformanten von REG19 entsprach. Bei der Deletion von *rapC/phrC* als auch von *rapH/phrH* in REG19 wurde davon ausgegangen, dass die Transformationsrate, im Vergleich zu REG19, gesteigert sein würde. Überraschenderweise wurde jedoch keine signifikante Veränderung festgestellt, die Transformationsraten waren eher vermindert. Möglicherweise liegt dies an der Redundanz der Funktionen und eine signifikante Änderung würde eventuell erst sichtbar werden, wenn zwei- oder drei *rap* Gene zusammen deletiert wären. Des Weiteren halbierte sich die Transformationsrate nach der *rapG/phrG* Deletion (REG112). Durch diese Deletion sollte sich die DegU~P Men-

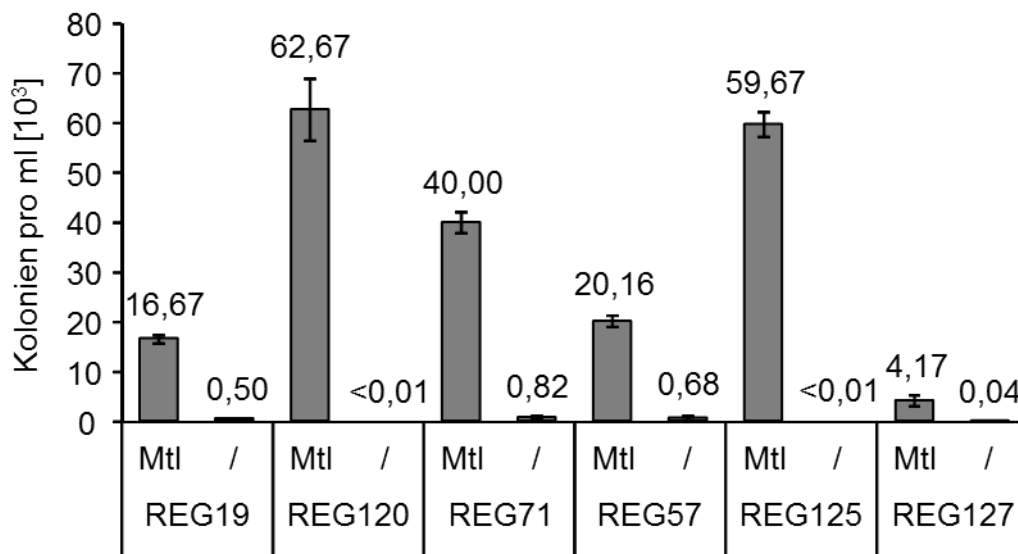
ge erhöhen und damit der Prozess der Differenzierung in Richtung der Sekretion extrazellulärer Enzyme und weg von der Kompetenz verschieben. Die Transformationsrate von REG112 veränderte sich unabhängig von der Mannitol Zugabe im gleichen Maße zu REG19 (Abbildung 37).

### 3.3.6 Auswirkung der Deletion von *degU*, *sinR*, *sinI* und *slrR* auf die Transformationsrate von REG19

Nachdem der Prozess der Differenzierung durch Phosphorylierung von Spo0A und Hemmung von AbrB angestoßen ist, entscheidet das Verhältnis einer Reihe von Transkriptionsregulatoren zueinander, welcher Weg der Differenzierung eingeschlagen wird (Abbildung 3 und Abbildung 8). Die wichtigsten Regulatoren sind die Zweikomponentensysteme ComP/ComA, DegU/DegS sowie die Transkriptionsfaktoren SinR/SinI zusammen mit SlrR. DegU~P wirkt negativ auf die Kompetenzausbildung, wie die Deletion von *rapG/phrG* vermuten ließ. Üblicherweise wird in dem Zweikomponentensystem DegU von DegS phosphoryliert, wodurch DegU unterschiedliche regulatorische Funktionen wahrnehmen kann. Nicht phosphoryliertes DegU initiiert die Kompetenz, indem es die *comK* Transkription aktiviert. DegU~P aktiviert dagegen ein vollständig anderes Set von Genen, insbesondere Gene für extrazelluläre Enzyme wie *aprE* (alkalische Exoprotease), *sacB* (Levansucrase) (Hayashi *et al.*, 2006) oder das *fla/che* Operon (Motilität) (Mordini *et al.*, 2013). Die homologen Proteine SinR (Transkriptionsregulator) und SlrR (Transkriptionsaktivator) regulieren sich einerseits gegenseitig über eine zweifach negative Rückkopplungsschleife, andererseits die Expression von *degU*. Der Antagonist von SinR, SinI, interagiert mit SinR und entscheidet, welches Protein bei der Rückkopplung dominiert. Wenn SlrR dominiert, assoziiert es mit SinR wobei Autolysin- und Motilitätsgene unterdrückt und die Kompetenz aktiviert werden. Wenn SinR dominant ist, hemmt es die Biofilmbildung, kann aber auch negativ auf die Kompetenz wirken (Abbildung 9). Da sich die Faktoren DegU, SinR, SinI und SlrR gegenseitig beeinflussen und dazu führen, dass die Zelle in unterschiedliche postexponentielle Zustände übergehen kann, wurden die Gene dieser Faktoren deletiert.

Um diese Gene zu deletieren, wurden ca. 700 bp große flankierende Regionen der Gene mittels PCR amplifiziert (*degU*: siehe Kapitel 3.3.2; *sinR*: Oligonukleotide s8606/s8607, s8608/s8609; *sinI*: Oligonukleotide s8610/s8611, s8612/s8613; *slrR*: Oli-

gonukleotide s9626/s9627, s9666/s9625) und in das Plasmid pJOE6743 mittels einer 3-Fragment Ligation eingefügt. Als Schnittstellen wurden *SphI* und *EcoRI* verwendet (*sinR*: pREG22; *sinI*: pREG33 und *slrR*: pREG74). Mit diesen Plasmiden wurde REG19 transformiert und die Mutanten mit den entsprechenden Deletionen nach der in Material und Methoden (Kapitel 2.4.12) beschriebenen Vorgehensweise isoliert ( $\Delta sinR$ : REG57;  $\Delta sinI$ : REG71 und  $\Delta slrR$ : REG127). Um Doppelmutation für *degU* und *sinI* zu erzeugen, wurde REG120 mit dem Plasmid pREG33 transformiert und daraus der Stamm REG125 ( $\Delta sinI \Delta degU$ ) isoliert. Die Stämme wurden mit der LB-Methode behandelt, mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert und mit REG19 verglichen. Die Transformationsrate steigerte sich, wenn die Gene *degU* und *sinI* in REG19 deletiert waren. Die Zahl der Transformanten mit REG120 ( $\Delta degU$ ) war im Vergleich zu REG19 um das 3,7 fache gesteigert (Abbildung 38). Die *sinI* Deletion (REG71) führte im Vergleich zur *degU* Deletion mit einer 2,3 fach gesteigerten Transformationsrate im Vergleich zu REG19 zu einer geringeren Steigerung.



**Abbildung 38: Transformationsrate der Stämme REG120 ( $\Delta degU$ ), REG71 ( $\Delta sinI$ ), REG57 ( $\Delta sinR$ ), REG125 ( $\Delta degU$ ,  $\Delta sinI$ ) und REG127 ( $\Delta slrR$ ) nach der Transformation mit pWAL275 in Dimerkonformation.** Die Stämme wurden mit der LB-Methode kompetent gemacht und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Zur Kontrolle wurden die Stämme auch ohne Mannitol Zugabe angezogen und transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Bei der Deletion von *sinR* kam es dagegen zu keiner signifikanten Veränderung der Transformationsrate im Vergleich zu REG19. Die Doppelmutante aus  $\Delta degU$  und  $\Delta sinI$  (REG125) wurde erzeugt, um zu testen, ob sich die Steigerungen der Transformationsraten der einzelnen Deletionen aus REG120 und REG71 in einer Doppelmutante addie-

ren. Der Stamm REG125 verhielt sich in etwa wie die *degU* Mutante REG120, d.h. eine weitere Steigerung war damit nicht möglich. Die Kontrollen (Transformationsansatz ohne Zugabe von Mannitol) korrelierten jedoch bei REG120 und REG125 nicht mit den Zellen, die mit Mannitol induziert wurden. In diesen beiden Stämmen konnte ohne Mannitol Zugabe keine Transformation festgestellt werden. Der Verlust von *slrR* (REG127) führte interessanterweise zu einer deutlichen Absenkung der Anzahl Transformanten im Vergleich zu REG19 (Abbildung 38).

### 3.3.7 Auswirkung der Deletionen von *maf*, *yneA* und *comZ* auf die Transformationsrate von REG19

Kompetente Zellen zeigen ein verändertes Wachstumsverhalten. Wie bekannt, sind kompetente Zellen für mehrere Stunden teilungsunfähig (Haijema *et al.*, 2001; Briley, Jr. *et al.*, 2011). Dies wurde auch hier, z.B. in Abbildung 23, gezeigt. Die Zellen des Stammes REG19 zeigten nach 1,5 h Inkubation mit Mannitol keine Zunahme der optischen Dichte, wenn sie für 1 h in frischem LB gerollert wurden. Der WT, mit und ohne Mannitol Zugabe, sowie REG19 ohne Mannitol Zugabe, zeigten dieses Phänomen nicht. Wieso aber zeigen *B. subtilis* Stämme in kompetentem Zustand ein verzögertes Wachstum? Ein entsprechendes Verhalten ist in anderen kompetenten Bakterienarten nicht zu beobachten (Biswas *et al.*, 1977; MacFadyen *et al.*, 2001). Eine mögliche Erklärung wäre, dass auf Grund der Aufnahme der großen DNA Mengen (bis zu einem Drittel des Genoms (Dubnau *et al.*, 1973)) die für die DNA Rekombination und Reparatur zuständigen Enzyme sehr stark ausgelastet sind, indem sie die transformationsbedingten DNA Brüche reparieren und die DNA zu rekombinieren versuchen. Daher muss möglicherweise die chromosomale Replikation und Zellteilung gestoppt werden (Hamoen, 2011). So konnte Haijema *et al.* (2001) zeigen, dass die ComGA ATPase, die die transformierende DNA bindet und transportiert, die wichtigste Rolle in diesem Zellteilungsstopp spielt. Neben ComGA führt ebenfalls eine induzierte Expression des *maf* Gens zu einem Zellteilungsstopp (Butler *et al.*, 1993), während eine Deletion die Hemmung dieser Zellteilung aufhebt (Briley, Jr. *et al.*, 2011). Weiterhin ist RecA von Bedeutung, ein multifunktionelles Protein, das für die DNA Reparatur und Rekombination notwendig ist und die SOS-Antwort reguliert. Die SOS-Antwort tritt auf, wenn die Zellen größere DNA-Schäden aufweisen bzw. die Replikation durch Schäden blockiert ist. Durch das Auslösen der SOS-Antwort, indem RecA den Regulator LexA inaktiviert, kommt es zu

einer YneA-vermittelten Hemmung der Zellteilung (Kawai *et al.*, 2003). Sowohl Maf als auch RecA stehen unter der Kontrolle von ComK. Da ComGA essentiell für die DNA Aufnahme ist und RecA Auswirkungen auf viele verschiedene Signalwege in der Zelle hat, sind hier nur *maf* und *yneA* in REG19 deletiert. Anschließend wurde das Zellwachstum dieser Mutanten sowie ihre Transformationseffizienz mit REG19 verglichen.

Für die Deletion des *maf* Gens wurden zwei ca. 700 bp große Fragmente vor und hinter dem Gen durch PCR amplifiziert (Oligonukleotide s8359/s8360 und s8355/s8356). Diese Fragmente wurden dann über eine 3-Fragment Ligation über die Schnittstellen *NheI* und *SacI* in den Vektor pJOE6743 integriert (pREG14) und anschließend REG19 mit dem Plasmid pREG14 transformiert (REG45). Die Deletion des *yneA* Genes wurde dadurch erzeugt, dass REG19 mit genomischer DNA des Stammes BKE11820 (*B. subtilis* 168 *yneA::erm*) transformiert wurde. Nach homologer Rekombination wurde das Gen *yneA* durch das Erythromycin Resistenzgen ersetzt (REG136). Die Stämme wurden anschließend nach der LB-Methode angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert.

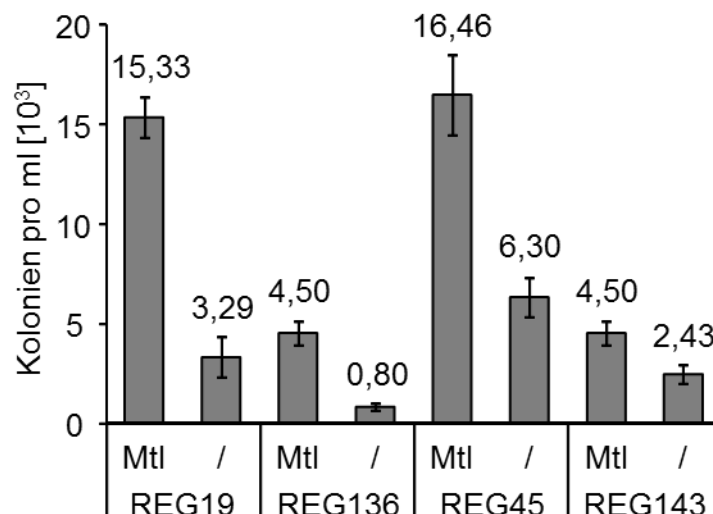
Überraschenderweise war auch in diesen Stämmen die Wachstumsinhibierung wie in dem Stamm REG19 während der Kompetenz zu beobachten (Tabelle 27). Darüber hinaus führte die Deletion des *yneA* Genes zu einer deutlichen Verminderung der Transformationsrate, während die Deletion von *maf* zu keiner signifikanten Veränderung führte. Da sowohl das *maf*- als auch das *yneA* Gen nicht für die Wachstumshemmung zuständig waren, musste ein anderer Faktor die Zellteilung blockieren, möglicherweise ComK selbst.

**Tabelle 27: Wachstum der Stämme REG19 (WT), REG136 ( $\Delta yneA$ ), REG45 ( $\Delta maf$ ) und REG143 ( $\Delta comZ$ ) bei der Ausbildung der Kompetenz und während der Transformation mit der LB-Methode.** Das Wachstum der Stämme wurde nach der dreistündigen Anzucht in LB-Medium mit und ohne Mannitol Zugabe nach 1,5 h (TK) und nach dem einstündigen Rollern (Rollern) über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) bestimmt. Als Referenz diente LB-Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Stamm	REG19	REG136	REG45	REG143
Induktion	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /
TK	1,00 1,2	1,06 1,17	0,82 1,01	0,82 1,09
Rollern	0,56 1,28	0,61 1,2	0,61 1,36	0,6 1,15

Da bei *Neisseria gonorrhoeae* (Biswas *et al.*, 1977) und *Haemophilus influenza* (MacFadyen *et al.*, 2001) kein Wachstumsstopp während der Kompetenz zu beobachten ist, sollte dieser nicht notwendig für die Kompetenz sein. Hahn *et al.* (2015) vermuteten, dass die Regulierung der Wachstumshemmung und der Kompetenz, sich aus ökonomischen Gründen bei *B. subtilis* gemeinsam entwickelt haben.

Über das Kompetenz Gen *comZ* (*yjzA*) ist wenig bekannt. Es kodiert für ein 63 Aminosäuren großes Protein und liegt zusammen mit dem Gen *med* in einem Operon, dem zwei mögliche ComK Boxen vorausgehen (Hamoen *et al.*, 1998; Kunst *et al.*, 1997; Ogura *et al.*, 1997). Ogura *et al.* (1997) konnten zeigen, dass eine *comZ* Deletion zu keiner veränderten *comK* Expression führte. Es wurde vermutet, dass ComZ möglicherweise ein Repressor des *comG* Operons darstellt, da sich die Deletion in einer Steigerung der *comG* Expression sowie in einer erhöhten Transformationsrate äußert. Die erhöhte Transformationsrate von *comZ* Mutanten führte zu der Überlegung, diese Mutation auch in REG19 einzuführen. Die Deletion wurde dadurch erzeugt, dass REG19 mit genomischer DNA des Stammes BKE11310 (*B. subtilis* 168 *comZ::erm*) transformiert wurde und über die Erythromycinresistenz ein Austausch von *comZ* mit dem *erm* Gen selektiert wurde (REG 143). Überraschenderweise führte jedoch der Verlust von *comZ* zu einer Verminderung der Transformationsrate (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Auswirkung der Deletion von *yneA*, *maf* und *comZ* auf die Transformationsrate von REG19.** Die Stämme REG136 ( $\Delta yneA$ ), REG45 ( $\Delta maf$ ) und REG143 ( $\Delta comZ$ ) wurden in LB-Medium (mit und ohne Mannitol Zugabe) angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.



### 3.3.8 Deletion des Kompetenz Repressorgens *kre* und der Sigma B und Sigma D kodierenden Gene *sigB* und *sigD* und ihre Wirkung auf die Transformationsrate von REG19

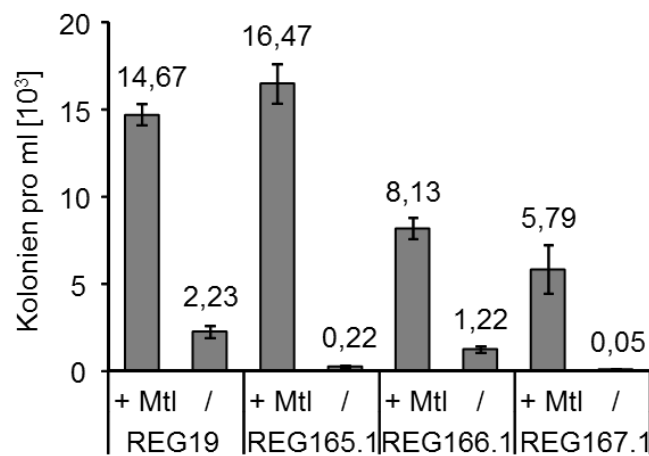
Neben der Regulation von *comK* durch mindestens sechs verschiedene Transkriptionsfaktoren (AbrB, CodY, Rok, Spo0A, DegU und ComK) (Abbildung 8) und der posttranskriptionellen Regulation durch MecA/ClpCP (Abbildung 6) haben Gamba *et al.* (2015) darüber hinaus festgestellt, dass Kre (ComK Repressor) ein weiterer Faktor ist, der die Expression von *comK* reguliert. Sie konnten zeigen, dass Kre die *comK* mRNA degradiert und eine Deletion von *kre* die Kompetenz in *B. subtilis* erhöht. Ob dies auch für REG19 zutrifft, wurde hier getestet.

Die Kompetenz von *B. subtilis* wird auch als Stressantwort gesehen. Stressantworten werden in *B. subtilis* und auch in vielen anderen Bakterien über Sigmafaktoren reguliert. Der Sigmafaktor  $\sigma$ B wird dann aktiviert, wenn die Zelle physiologischen Stress wie Hitze, Säure, hohen Salz- oder Lösungsmittelkonzentrationen, aber auch Nahrungs- und Sauerstoffmangel ausgesetzt ist. Die Aktivierung der sogenannten generellen Stressantwort betrifft zirka 200 Gene in *B. subtilis*, unter anderem scheinen auch *comK* und *spo0A* betroffen zu sein. Daher wurde *sigB* in REG19 deletiert, um möglicherweise eine Steigerung der Transformationsrate zu erreichen.

Das Gen des Sigmafaktors  $\sigma$ D befindet sich am Ende des *fla/che* Operons und wird in der vegetativen Wachstumsphase (Gilman & Chamberlin, 1983) exprimiert. Er kontrolliert die Autolysine und ist weiterhin notwendig für die Flagellensynthese, Motilität und für chemotaktische Funktionen (Helmann *et al.*, 1988; Márquez *et al.*, 1990). Da die Motilität einer der Gegenspieler der Kompetenz ist, könnte eine Deletion dieses Sigmafaktors zu einer gesteigerten Transformationseffizienz in REG19 führen.

Die Deletionen in REG19 wurden mittels Gibson Assembly erzeugt. Für jede Deletion wurden 3 Fragmente mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dafür wurde die Q5 Polymerase (NEB, Frankfurt a. M.) verwendet. Das erste Fragment liegt stromaufwärts des Gens, das zweite Fragment enthält ein Chloramphenicol Resistenzgen mit der Sequenz *mroxP* in den flankierenden Bereichen und das dritte Fragment liegt stromabwärts des zu deletierenden Gens. Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:  $\Delta$ *kre*: s10633, s10634 und s10635, s10636 und s10637, s10638;  $\Delta$ *sigB*: s10639, s10640 und s10641, s10642 und s10643, s10644;  $\Delta$ *sigD*: s10645, s10646 und s10647, s10648 und s10649, s10650. Als Matrizen wurden für das erste und das dritte Fragment die genomische DNA von *B. subtilis* 168 verwendet, für das zweite Fragment die DNA des Plasmids pJOE8688.

Auf Grund der ca. 15 Basenpaar überlappenden Enden konnten die jeweils drei Fragmente über Gibson Assembly miteinander ligiert werden. Anschließend wurde REG19 damit transformiert und die Transformanten über die Chloramphenicolresistenz selektioniert ( $\Delta kre$ : REG165,  $\Delta sigB$ : REG166 und  $\Delta sigD$ : REG167). Danach wurden diese drei Stämme mit pJOE6732 transformiert, um die Chloramphenicolresistenzkassette durch eine ortsspezifische Rekombination zu entfernen. Diese neu konstruierten Stämme ( $\Delta kre$ : REG165.1,  $\Delta sigB$ : REG166.1 und  $\Delta sigD$ : REG167.1) wurden in LB-Medium mit und ohne Mannitol Zugabe mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert und die Transformationsrate mit REG19 verglichen (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Auswirkung der Deletionen von *kre*, *sigB* und *sigD* in REG19 auf die Transformationsrate.** Die Stämme REG165.1 ( $\Delta kre$ ), REG166.1 ( $\Delta sigB$ ) und REG167.1 ( $\Delta sigD$ ) wurden in LB-Medium (mit und ohne Mannitol Zugabe) angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Eine Deletion des *kre* Gens in REG19 führe zu einer geringen Verbesserung der Transformationsrate mit  $1,6 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur im Vergleich zu REG19 mit  $1,4 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur. Dagegen zeigten die Stämme mit *sigB* bzw. *sigD* Deletion eine verringerte Transformationsrate. Mit 8130 Kolonien pro ml Kultur war die Transformationsrate von REG166.1 (*sigB*) um 45 % verringert und bei REG167.1 (*sigD*) sogar um 61 % im Vergleich zu REG19. Das Wachstum der Kulturen, während der Anzucht für die Transformation, war bei allen drei Deletionsmutanten im Vergleich zu REG19 geringfügig vermindert.

**Tabelle 28: Wachstum der Stämme REG19 (WT), REG165.1 ( $\Delta kre$ ), REG166.1 ( $\Delta sigB$ ) und REG167.1 ( $\Delta sigD$ ) bei der Anzucht und Induktion zur Kompetenz sowie während der Transformation.** Die Stämme wurden 1,5 h in LB bei 37 °C angezogen, mit 0,5 % Mannitol (w/v) versetzt und weiter für 1,5 h auf einem Schüttler inkubiert (TK). Nach dem Waschen wurden die Kulturen mit 100 ng pWAL275 Plasmid-DNA versetzt und weiter auf dem Roller für 1 h inkubiert (Rollern). Das Wachstum der Stämme wurde über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) bestimmt. Als Referenz diente LB-Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Stamm	REG19	REG165.1	REG166.1	REG167.1
Induktion	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /
TK	0,96 1,05	0,67 0,94	0,79 0,82	0,81 0,84
Rollern	0,57 1,12	0,58 1,04	0,55 1,24	0,6 1,1

### 3.3.9 Auswirkung der Deletion von *dprA*, *addA*, *recJ* und *recA* auf die Transformationsrate von REG19

Der DNA-Aufnahmeprozess bei der Transformation beginnt zunächst mit einem Doppelstrangbruch und anschließend wird ein Strang abgebaut. Daher liegt die aufgenommene DNA als Einzelstrang in der Zelle vor. Einzelsträngige DNA kommt üblicherweise nur an Replikationsgabeln, vor allem aber bei bestimmten DNA-Schäden in der Zelle vor, welche durch Abbau des beschädigten DNA-Strangs und Auffüllen mit Hilfe der DNA-Polymerasen repariert wird. Eines der für den Abbau verantwortlichen Enzyme ist RecJ, welches als einzelstrangspezifische Exonuklease den Einzelstrang in 5'-3'-Richtung abbaut (Sanchez *et al.*, 2005; Lenhart *et al.*, 2012). Damit die bei der Transformation aufgenommene DNA nicht abgebaut wird, binden sogenannte Einzelstrang-Bindeproteine (DprA, SsbA, SsbB und RecN) an den Einzelstrang und schützen diesen vor dem Abbau (Inamine & Dubnau, 1995). Danach lädt DprA das Protein RecA auf den Einzelstrang und unterstützt es bei der Verdrängung der Einzelstrang-Bindeproteine, sodass sich ein rekombinationsfähiges Nukleofilament ausbilden kann. Neben der homologen Rekombination aufgenommener Fremd-DNA mit dem Chromosom, wird die homologe Rekombination für die Reparatur nach einem Doppelstrangbruch benötigt. Damit RecA binden kann, müssen an den Enden des Doppelstrangbruchs zunächst einzelsträngige Bereiche geschaffen werden. Dies ist die Aufgabe von AddAB, einem Helikase-Nuklease-Komplex (AddAB). AddAB entwindet und baut den DNA-Doppelstrang ab, bis eine speziesspezifische, sogenannte Chi-Sequenz erreicht wird. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung. Diese führt dazu, dass ein

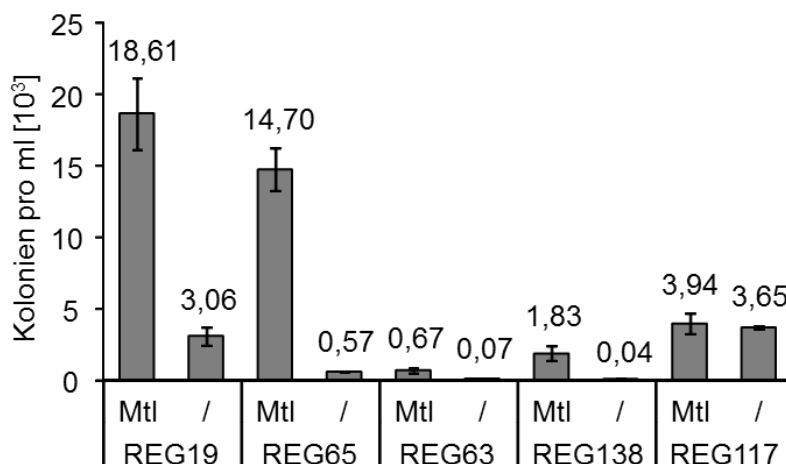
3'-überstehender Einzelstrang entsteht, an den RecA geladen werden kann. Da AddAB eine wichtige Rolle bei der Transformation chromosomaler DNA spielt, unterliegen auch die Gene *addA* und *addB* der Kontrolle durch ComK.

Die Gene *recJ*, *dprA*, *addA*, und *recA* wurden in REG19 deletiert, um deren Auswirkung auf die Kompetenz zu bestimmen. Für die Deletion von *recJ* wurden zunächst ca. 700 bp große flankierende Regionen des Gens amplifiziert (s8685/s8686 und s8687/s8688) und mittels einer 3-Fragment Ligation über die Schnittstellen *HindIII* und *EcoRI* in pJOE6743 eingefügt (pREG25) und damit REG19 transformiert. Die entsprechende *recJ* Mutante wurde mit REG65 bezeichnet.

Für die *dprA* Deletion in REG19 wurden ca. 700 bp große flankierende Regionen des Gens amplifiziert (s8695/s8696 und s8697/s8698). Mittels einer 3-Fragment Ligation und über die Schnittstellen *HindIII* und *EcoRI* wurden die Fragmente in pJOE6743 eingefügt (pREG28) und REG19 mit pREG28 transformiert. Dabei wurde die Mutante REG63 erhalten. Für die Deletion von *addA* in REG19 wurde dieser mit chromosomaler DNA des Stammes BKE1630 transformiert. Der Stamm BKE10630 ist eine Mutante, bei der *addA* durch ein Erythromycin Resistenzgen ersetzt war. Die entsprechende REG19 Mutante wurde mit REG138 bezeichnet. Für die Inaktivierung von *recA* wurde dieses Gen aus *B. subtilis* 168 mit Hilfe der Oligonukleotide s8791 und s8792 amplifiziert und über die Schnittstellen *BamHI* in pJOE4786 integriert (pREG31). Das Chloramphenicol Resistenzgen wurde aus dem Plasmid pJOE8688 mit Hilfe der Oligonukleotide s9092 und s9093 amplifiziert und anschließend in die *EagI* Schnittstelle von *recA* in pREG31 eingefügt (pREG47). REG19 wurde darauf folgend mit pREG47 transformiert. Die Transformanten wurden auf chloramphenicolhaltigen Agarplatten selektiert, wodurch die Mutante REG117 erhalten werden konnte.

Die REG19 Stämme mit  $\Delta recJ$ ,  $\Delta dprA$ ,  $\Delta addA$  und  $\Delta recA$  wurden in LB-Medium mit und ohne Mannitol Zugabe angezogen und mit pWAL275 Plasmid DNA in Dimerkonformation transformiert (Abbildung 41). Durch die *recJ* Deletion in REG19 zeigte sich eine Verminderung der Transformationsrate. Es entstanden  $1,47 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur bei REG65 im Vergleich zu  $1,8 \times 10^4$  Kolonien pro ml bei REG19. Offensichtlich ist die aufgenommene DNA gegenüber RecJ ausreichend in der Zelle geschützt, sodass sich hier keine Verbesserung der Transformationsrate ergab. Ein anderes Bild zeigte sich, wenn *dprA*, *addA* und *recA* in REG19 deletiert waren. In allen drei Mutanten war die Transformation mit Plasmid-DNA stark reduziert (Abbildung 41). Der Stamm REG63 ( $\Delta dprA$ ) wies mit 670 Kolonien pro ml Kultur eine sehr geringe Trans-

formationsrate auf, ebenso der Stamm REG138 ( $\Delta addA$ ) mit 1833 Kolonien pro ml. Mit  $3,94 \times 10^3$  Kolonien pro ml Kultur bei dem Stamm REG117 ( $\Delta recA$ ) war die Transformationsrate im Vergleich zu REG19 um 79 % reduziert. Auffällig war hierbei, dass der Stamm REG117 extrem kleine Kolonien aufwies und das Wachstumsverhalten sich zwischen den Transformationskulturen stark unterschied (Tabelle 29).



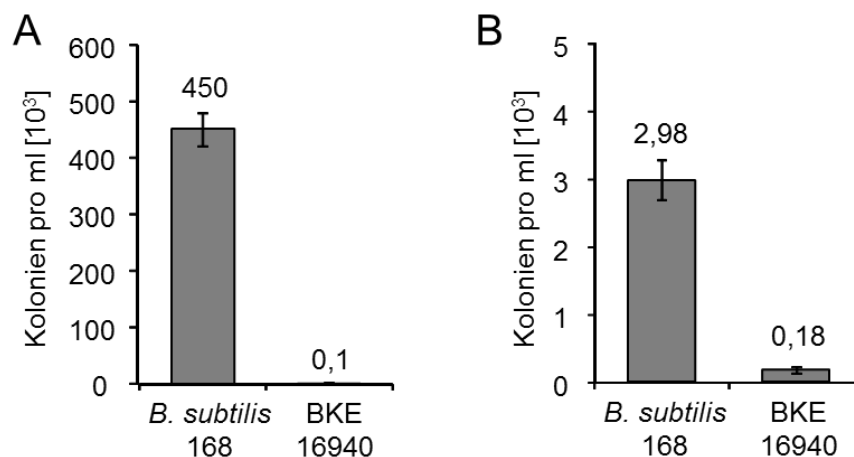
**Abbildung 41: Transformationsrate der Stämme REG19 (WT), REG65 ( $\Delta recJ$ ), REG63 ( $\Delta dprA$ ), REG138 ( $\Delta addA$ ) und REG117 ( $\Delta recA$ ) bei der Verwendung von pWAL275 Plasmid DNA.** Die Stämme REG65 ( $\Delta recJ$ ), REG63 ( $\Delta dprA$ ), REG138 ( $\Delta addA$ ) und REG117 ( $\Delta recA$ ) wurden in LB-Medium (mit und ohne Mannitol Zugabe) angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

**Tabelle 29: Wachstum der Stämme REG19 (WT), REG65 ( $\Delta recJ$ ), REG63 ( $\Delta dprA$ ), REG138 ( $\Delta addA$ ) und REG117 ( $\Delta recA$ ) bei der Anzucht und Induktion zur Kompetenz sowie während der Transformation.** Die Stämme wurden 1,5 h in LB bei 37 °C angezogen, mit 0,5 % Mannitol (w/v) versetzt und weiter für 1,5 h auf einem Schüttler inkubiert (TK). Nach dem Waschen wurden die Kulturen mit 100 ng pWAL275 Plasmid-DNA versetzt und weiter auf dem Roller für 1 h inkubiert (Rollern). Das Wachstum der Stämme wurde über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) bestimmt. Als Referenz diente LB-Medium. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Stämme	REG19	REG65	REG63	REG138	REG117
Induktion	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /	Mtl /
TK	1,05 1,2	1,56 1,68	0,86 0,84	1,00 0,9	1,03 1,04
Rollern	0,65 1,26	0,73 1,59	0,50 0,92	0,65 1,1	0,68 1,01

Die deutliche Abnahme der Transformationsrate des Stammes REG117 stimmt nicht mit den Ergebnissen aus der Literatur überein. Kidane *et al.* (2012) zeigten eine Trans-

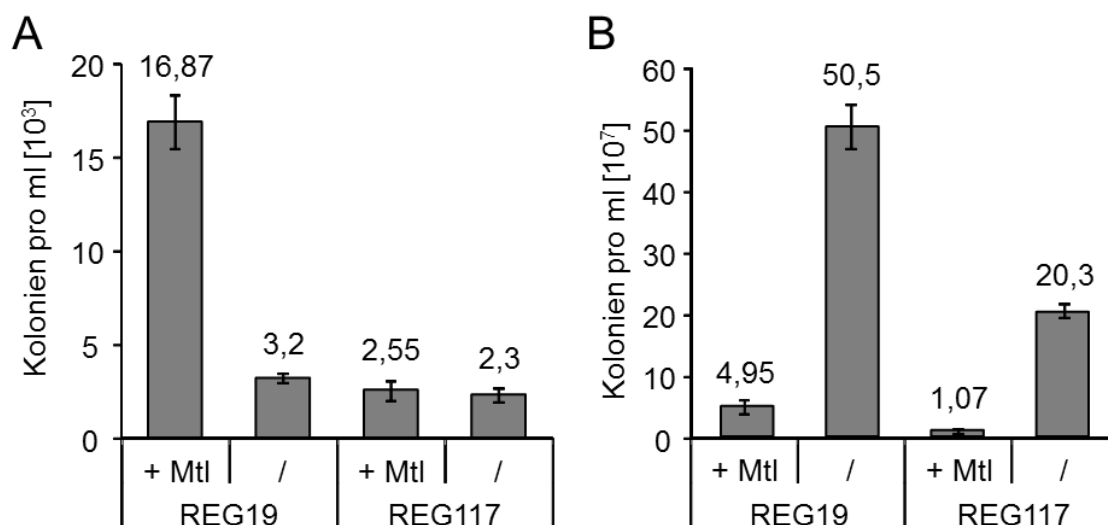
formationsrate von 98 %, wenn *B. subtilis*  $\Delta recA$  mit Plasmid-DNA transformiert wurde. Im Falle von chromosomaler DNA war die Transformationsrate geringer als 0,1 % (Kidane *et al.*, 2012). Daher wurden die Stämme *B. subtilis* 168 und der BKE16940 (*B. subtilis* 168 *recA::ermC*) in MG-Medium kompetent gemacht und mit dem Plasmid pWAL275 in Dimerkonformation, als auch mit chromosomaler KM0 DNA transformiert. Die Transformationsrate des BKE16940 Stammes betrug nach der Transformation von chromosomaler DNA weniger als 100 Kolonien pro ml, wobei der Wildtyp  $4,5 \times 10^5$  Kolonien pro ml bildete (Abbildung 42A). Dies entsprach dem Ergebnis aus der Literatur. Die Transformation dieses Stammes mit Plasmid-DNA pWAL275 wies ebenfalls eine sehr geringe Transformationsrate auf, wenn das *recA* Gen deletiert war. Es entstanden 180 Kolonien pro ml bei dem Stamm BKE16940 im Vergleich  $2,98 \times 10^3$  Kolonien pro ml beim WT (Abbildung 42B).



**Abbildung 42: Auswirkung der *recA* Deletion in *B. subtilis* 168 auf die Transformation.** Die Stämme *B. subtilis* 168 (Kontrolle) und BKE16940 (*B. subtilis* 168 *recA::erm*) wurden in MG-Medium angezogen, nach der Paris Methode behandelt und in (A) mit 3  $\mu$ g chromosomale DNA des Stammes KM0 transformiert sowie in (B) mit 100 ng Plasmid DNA pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Zur weiteren Erklärung der unterschiedlichen Werte zur Literatur wurde die Lebendzellzahl der Transformationskultur von REG19 und REG117 bestimmt. Dafür wurden die Kulturen der Stämme REG19 und REG117 nach dem Rollern auf LB<sub>0</sub> Platten ausplattiert. Zur Kontrolle der Transformationsrate wurden die Kulturen ebenfalls auf Platten mit Kanamycin ausplattiert. Die Werte der optischen Dichte der beiden Stämme waren fast identisch (OD<sub>600nm</sub> Stamm REG19:0,6; OD<sub>600nm</sub> Stamm REG117: 0,65). Im Fall der Induktion war die Lebendzellzahl bei dem Stamm REG117 im Vergleich zu

dem Stamm REG19 um den Faktor 4,6 reduziert. Ohne Induktion kam es zu einer 2,4 fachen Reduktion (Abbildung 43B).



**Abbildung 43: Vergleich der Transformationsrate (A) und absoluten Lebendzellzahl nach der Transformation (B) von REG19 und REG117.** Die Stämme REG19 und REG117 (*ΔrecA*) wurden in LB-Medium (mit und ohne Mannitol Zugabe) angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Die Kulturen wurden sowohl auf Platten mit Kanamycin (A) als auch auf LB<sub>0</sub> Platten (B) ausplattiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.4 Untersuchungen zur Plasmidetablierung in REG19

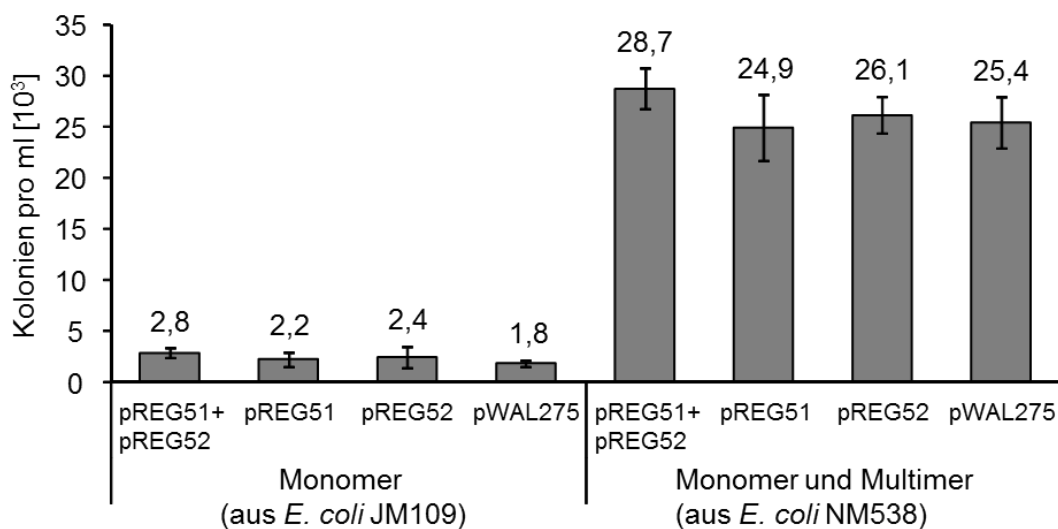
Die Etablierung von Plasmid-DNA nach der Transformation von *B. subtilis* ist auf molekularer Ebene nicht ausreichend verstanden und wirft noch einige Fragen auf. So ist in der Literatur beschrieben, dass eine Plasmid-Transformation mit einem Monomer in *B. subtilis* nicht möglich ist (Eisenstein *et al.*, 1977; Claverys & Lacks, 1986). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abbildung 21). Zudem gibt es unterschiedliche Meinungen über den genauen Vorgang der Plasmid-DNA Etablierung nach der Transformation in der Zelle, daher wurde dies im Folgenden nochmals untersucht. Es gibt zwei unterschiedliche Hypothesen, wie sich ein Plasmid in der Zelle etablieren kann. Saunders & Guild (1981) behaupten, dass der aufgenommene Einzelstrang durch eine DNA-Polymerase zum Doppelstrang mit überstehenden Einzelstrang Enden wird. Bei einer Dimerkonformation sollen die überstehenden Einzelstränge zueinander komplementär sein und durch DprA oder RecO zu einem Ring geschlossen werden können. Auftretende Einzelstranglücken sollen durch DNA-Polymerasen aufgefüllt und die Ein-

zelstrangbrüche schließlich durch eine Ligase geschlossen werden können. Bei einer Monomerkonformation gibt es dagegen keine komplementären Enden. Daher ist es nicht möglich, dass ein Plasmid in Monomerkonformation nach der Transformation etabliert werden kann (de Vos *et al.*, 1981; Kidane *et al.*, 2009). Dagegen steht die Behauptung, dass zwei komplementäre Einzelstränge aufgenommen und in komplementären Regionen aneinandergelagert werden. Durch Auffüllen und Verschließen der Lücken wird das Plasmid zirkularisiert (Zadrazil & Sponar, 1980; de Vos *et al.*, 1981). Nach dieser Hypothese sollte die Transformation auch mit monomeren Plasmiden erfolgreich sein, jedoch mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit.

Um die Etablierung von Plasmiden in *B. subtilis* zu untersuchen, wurden zwei Plasmide erzeugt. Die Plasmide pREG51 und pREG52 haben als Grundgerüst das Plasmid pWAL275 (Plasmidkarten in Kapitel 6.1). Zusätzlich wurden jeweils ein mutiertes Spectinomycin Resistenzgen (*aad9*) eingefügt. Das *aad9* Gen im Plasmid pREG51 enthält eine Punktmutation, wodurch ein Stoppcodon entsteht, sodass nur ein Drittel des Gens translatiert werden kann. Dafür wurden zunächst zwei PCR-Reaktionen mit pMW168 als Matrize durchgeführt. Die erste PCR Reaktion amplifiziert das Spectinomycin Resistenzgen bis zum gewünschten Codon, das in ein Stoppcodon umgewandelt werden soll. Dafür wurden die Oligonukleotide s9216 und s9217 verwendet. Die zweite PCR-Reaktion amplifiziert ausgehend von dem Codon, das in ein Stoppcodon umgewandelt werden soll, bis zum Ende des Spectinomycin Resistenzgens. Dafür wurden die Oligonukleotide s9218 und s9219 verwendet. Mit einer fusionierenden PCR-Reaktion und den beiden Amplifikaten als Matrizen sowie den Oligonukleotiden s9216 und s9219 wurden die Fragmente so fusioniert, dass die Punktmutation in das Spectinomycin Resistenzgen eingefügt wurde. Dieses neu entstandene Amplifikat wurde nun über die Schnittstelle *EagI* in das Plasmid pWAL275 integriert (pREG51). In pREG52 ist das Gen *aad9* so verändert, dass zwei Drittel des Gens translatiert werden können. Die Klonierung erfolgte identisch zu pREG51. Für die erste PCR-Reaktion wurden die Oligonukleotide s9216 und s9220 verwendet. Für die zweite PCR die Oligonukleotide s9221 und s9219. Diese beiden Amplifikate dienten als Matrizen und die Oligonukleotide s9216 und s9219 als Primer für die Fusions-PCR. Dieses dabei entstandene Amplifikat wurde nun ebenfalls über die Schnittstelle *EagI* in pWAL275 eingefügt (pREG52). Die Plasmide wurden sowohl in *E. coli* JM109 als auch in *E. coli* NM538 vervielfältigt und isoliert. Die Plasmide, die aus *E. coli* JM109 isoliert wurden, lagen in Monomerkonformation vor, wobei die Plasmide aus *E. coli* NM538 in Mono-



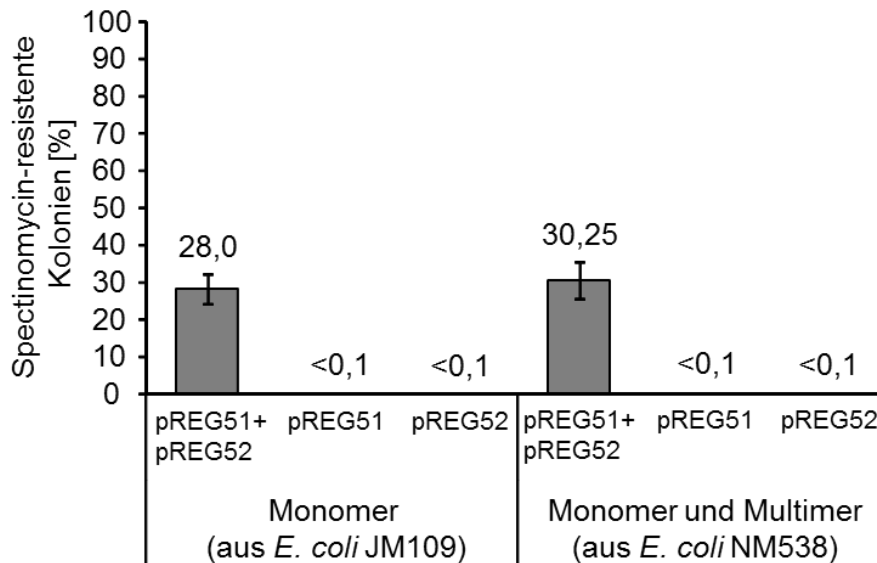
mer- als auch in Dimerkonformation vorlagen. Der Stamm REG19 wurde mit der LB-Methode behandelt und mit einer Mischung aus den Plasmiden pREG51 und pREG52 transformiert. Die Mischung enthielt die Plasmide im Verhältnis 1:1 und die Konzentration der Plasmide betrug 200 ng/ml. Die Mischung enthielt entweder die Plasmide in der Monomerkonformation oder in der Dimerkonformation. Die Selektion erfolgte durch die Kanamycinresistenz. Eine weitere Selektion erfolgte durch anschließendes Picken der Kolonien auf Agarplatten mit Spectinomycin. Mit der Selektion auf Kanamycin ergaben sich  $28 \times 10^3$  Kolonien (aus *E. coli* NM538) und  $2,4 \times 10^3$  (in Monomerkonformation) pro ml Kultur. Diese Transformationsrate entspricht den Ergebnissen der Transformation mit dem Plasmid pWAL275 (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Anzahl an kanamycinresistenten Kolonien bei der Transformation von REG19 mit pREG51 und pREG52.** Der Stamm REG19 wurde mit Hilfe der LB-Methode kompetent gemacht und mit jeweils 200  $\mu\text{g}$  der Plasmide pREG51 und pREG52 zusammen und einzeln sowie mit 200  $\mu\text{g}$  des Plasmides pWAL275 transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

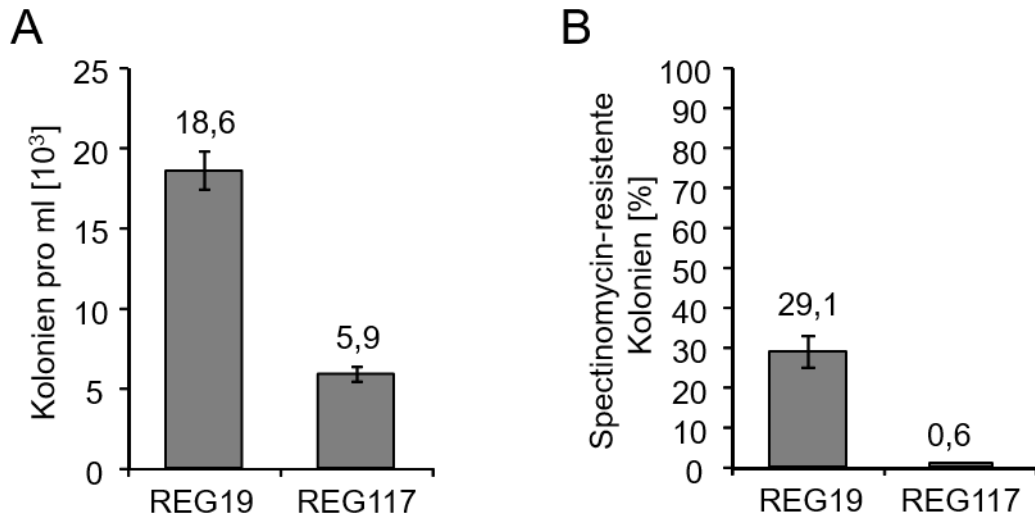
Jeweils 100 dieser kanamycinresistenten Kolonien wurden auf ihre Spectinomycinresistenz getestet. 30,25 % der Kolonien waren ebenfalls spectinomycinresistent, wenn die Plasmide aus *E. coli* NM538 isoliert wurden. Wenn die Plasmide aus *E. coli* JM109 isoliert wurden, waren 28 % der Kolonien spectinomycinresistent. Als Kontrolle wurden ebenfalls Kolonien von der Transformation der einzelnen Plasmide pREG51 und pREG52 auf die Spectinomycinresistenz getestet. Dabei entstanden jedoch keine spectinomycinresistenten Kolonien (Abbildung 45). Dies ließ darauf schließen, dass es zu einer Rekombination der beiden Plasmide gekommen sein musste. Eine Erklärung dafür ist: Damit sich ein Plasmid etablieren kann, müssen jeweils zwei komplementäre DNA-

Stränge aufgenommen werden. Bei der gleichzeitigen Aufnahme von zwei Plasmiden würden in 50 % der Fälle die beiden Stränge von einem Plasmid kommen und in 50 % von den zwei unterschiedlichen Plasmiden, die dann in der Zelle zum Doppelstrang gepaart werden können. Da sich die Stränge aber auf Grund der beiden Mutationen im *aad9* Gen unterscheiden, kommt es zu zwei Fehlpaarungen, die vom DNA-Reparatursystem erkannt und repariert werden. Diese Reparatur erfolgte in 30 % der Fälle und führte zu einer Spectinomycinresistenz (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Prozentsatz an spectinomycinresistenten Kolonien bei der Transformation von REG19 mit pREG51 und pREG52.** 100 kanamycinresistente Kolonien, der Transformation von REG19 mit den Plasmiden pREG51 und pREG52 in Kombination oder einzeln, wurden auf Spectinomycin Platten gepickt. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Identisch dazu wurde der Stamm REG117 (REG19 *recA::cm*) ebenfalls mit den Plasmiden pREG51 und pREG52, isoliert aus *E. coli* NM538, transformiert. Die Zahl der kanamycinresistenten Kolonien entsprach mit 5900 Kolonien pro ml vorangegangenen Versuchen in Abbildung 41. Bei dem Stamm REG117 zeigte sich anschließend, dass weniger als 1 % der Kolonien neben der Kanamycin zusätzlich eine Spectinomycinresistenz ausbildeten. Bei dem Stamm REG19 waren dies wie in vorangegangenen Versuchen knapp 30 %. Dies deutet darauf hin, dass das Gen *recA* notwendig ist für die Rekombination der beiden Allele bzw. deren Reparatur.

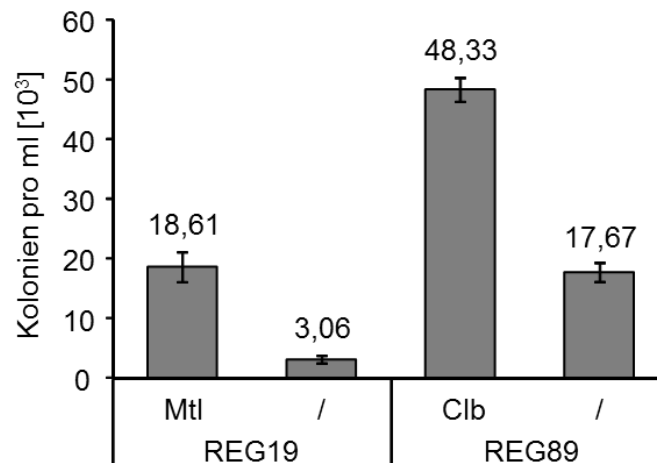


**Abbildung 46: Auswirkung der Deletion von *recA* auf die Rekombination zweier Gene, die an verschiedenen Stellen mutiert sind.** Die Stämme REG19 (WT) und REG117 ( $\Delta recA$ ) wurden mit Hilfe der LB-Methode kompetent gemacht und mit jeweils 200  $\mu$ g der Plasmide pREG51 und pREG52 transformiert und die Zahl der kanamycinresistenten Kolonien ermittelt (A). 100 kanamycinresistente Kolonien der Transformation von REG19 und REG117 mit den Plasmiden pREG51 und pREG52 in Kombination wurden auf Spectinomycin Platten getestet und darüber die Prozentzahl an spectinomycinresistenten Kolonien bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.5 Test eines weiteren Promotors zur Expression von *comK* und *comS*

Die mit Mannitol induzierte Kompetenz von REG19 ist sowohl von dem natürlichen als auch dem Mannitol induzierten *comK* Genen abhängig. Offensichtlich stimuliert das durch  $P_{mIA}$  exprimierte ComK die Aktivierung des nativen  $P_{comK}$  Promotors und erst die Expression beider *comK* Gene führt dann schließlich zur Kompetenz der Zellen in Vollmedium. Der *B. subtilis* Mannitol induzierbare Promotor ( $P_{mIA}$ ) in REG19 wurde durch den Cellibiose (Cib) induzierbaren Promotor ( $P_{licB}$ ) ersetzt (REG89). Damit wurde geprüft, ob der Promotor  $P_{licB}$  die Kompetenz aktivieren kann, wenn das native *comK* deletiert ist. Dafür wurde *comK* zusammen mit *comS* durch PCR mit den Oligonukleotiden s8856 und s8857 sowie pJOE7361 als Matrize amplifiziert. Anschließend wurde das Amplifikat über die Schnittstellen *Afl*III und *EcoRV* in das Plasmid pKAM160 so integriert, dass die Gene *comK* und *comS* unter der Kontrolle des  $P_{licB}$  Promotor sind (pREG36). Das Insert aus  $P_{licB}$ -*comK*-*comS* wurde daraufhin über die Schnittstelle *NheI* in das Plasmid pHM31 eingebracht (pREG37). Mit dem Plasmid pREG37 wurde der

Stamm REG1 transformiert und durch die Selektion auf Histidin prototrophe Kolonien auf MG-Agarplatten ohne Histidin die Integration der  $P_{licB}$ -*comK-comS* Kasette zwischen *hisI* und *yvcA* im Genom von REG1 erhalten (REG89). Die Stämme REG19 und REG89 wurden mit der LB-Methode behandelt, mit dem Plasmid pWAL275 in Dimerkonformation transformiert und die Transformationsrate bestimmt. Der Stamm REG89 wurde anstelle von Mannitol mit Cellibiose (0,5 % w/v) induziert.



**Abbildung 47: Auswirkung der induzierten *comK* und *comS* Expression mittels verschiedener Promotoren ( $P_{mtA}$  und  $P_{licB}$ ) auf die Transformationsrate.** Die Stämme REG19 und REG89 ( $P_{licB}$ -*comK-comS*) wurden in LB-Medium mit und ohne Mannitol Zugabe bzw. bei REG89 mit und ohne Cellibiose angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Der Austausch des Promotors führte mit  $4,8 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur bei dem Stamm REG89 im Vergleich zu  $1,8 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur zu einer 2,5-fachen Steigerung der Transformationsrate. Auch ohne Zugabe des Induktors Cellibiose war die Transformationsrate von REG89 mit  $1,7 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur deutlich höher als bei REG19 mit  $0,3 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur (Abbildung 47). Das Wachstumsverhalten der beiden Stämme während der Kompetenzausbildung und Transformation ist in Tabelle 30 dargestellt. Auch in REG89 führte die Kompetenzaktivierung zu einem verminderten Wachstum. Dies zeigte sich darin, dass der REG89 Stamm nach Zugabe von Cellibiose gerade einmal eine optische Dichte von 0,8 nach 3 h Inkubation erreichte. Der Stamm REG19 dagegen hatte zu diesem Zeitpunkt eine optische Dichte von 1,05. Die Wachstumshemmung, die sich bei REG19 in der Rollerkultur nach der Verdünnung in frischem Medium zeigte, war ebenfalls in REG89 zu beobachten. Ohne den Induktor Cellibiose unterblieb diese Hemmung, jedoch war auch hier das Wachstum

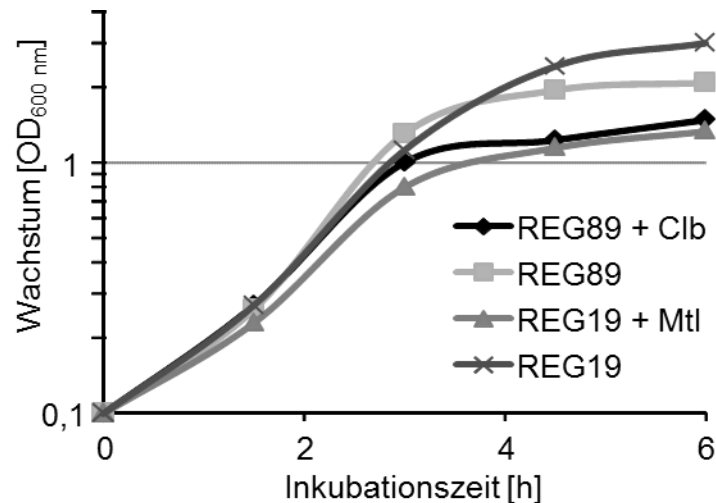
von REG89 geringer als von REG19. Die beiden Stämme unterschieden sich auch in den Koloniegroße. Der Stamm REG19 zeigte im Vergleich zu REG89 überwiegend größere Kolonien. Diese waren wie der WT in der Mitte der Kolonie schleimig und am Rand verkrustet und erschienen rau. REG89 dagegen zeigte durchgängig schleimige und im Durchmesser deutlich kleinere Kolonien (nicht gezeigt).

**Tabelle 30: Wachstum der Stämme REG19 und REG89 ( $P_{licB}$ ) bei der Anzucht und Induktion zur Kompetenz sowie während der Transformation.** Die Stämme wurden 1,5 h in LB-Medium bei 37 °C angezogen. Anschließend wurde der Stamm REG19 mit 0,5 % Mannitol und der Stamm REG89 mit 0,5 % Cellibiose versetzt. Die Kulturen wurden anschließend für weitere 1,5 h auf einem Schüttler inkubiert (TK) und nach dem Waschen mit 100 ng pWAL275 Plasmid-DNA versetzt. Es folgte weiter eine Inkubation von 1 h auf dem Roller (Rollern). Das Wachstum wurde über die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Stamm	REG19		REG89	
Induktion	Mtl	/	Clb	/
TK	1,05	1,2	0,8	1,39
Rollern	0,65	1,26	0,7	1,2

Zur weiteren Wachstumsanalyse wurde REG19 mit REG89 in Wachstumsexperimenten verglichen (Abbildung 48). Nach 1,5 h wurde je eine Kultur der beiden Stämme induziert. Dafür wurde für REG19 0,5 % Mannitol und für REG89 0,5 % Cellibiose verwendet. Das Wachstumsexperiment zeigte, dass sich durch die Zuckerzugabe bei beiden Kulturen nach 4,5 h das Wachstum verschlechtert hatte.

Die Transformationsrate von REG19 nahm stark ab, wenn das native *comK* Gen deletiert war (siehe Abbildung 31). Da der Stamm REG89, mit  $P_{licB}$  als induzierbarem Promotor für *comK* und *comS*, eine deutlich höhere Transformationsraten erzielte als REG19, lies dies vermuten, dass dieser eine geringere Abhängigkeit zu dem nativen *comK* hatte. Daher wurde das native *comK* Gen in REG89 deletiert, indem REG89 mit dem Plasmid pREG13 transformiert wurde und das native *comK* Gen mit Selektion auf Spectinomycinresistenz und Mannose Gegenselektion entfernt wurde (REG159). Anschließend wurde die Transformationsraten für das Plasmid pWAL275 der beiden Stämme bestimmt und miteinander verglichen.

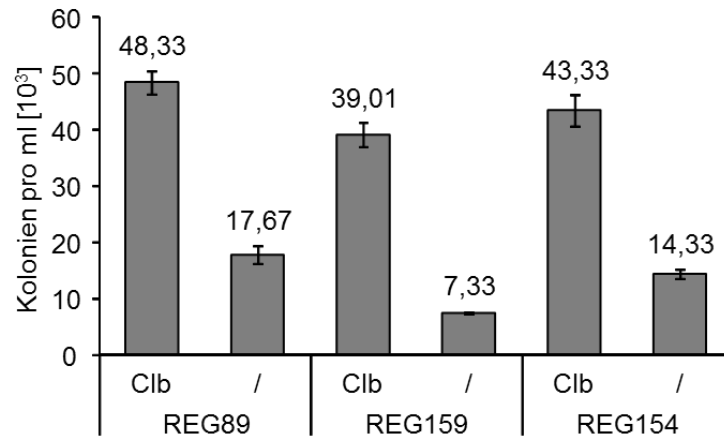


**Abbildung 48: Vergleich des Wachstums von REG19 und REG89 mit und ohne Zugabe von Mannitol bzw. Cellibiose in LB-Medium bei 37 °C.** Jeweils 10 ml LB wurden in einem 100 ml Schikanekolben mit einer Übernachtskultur von REG19 bzw. REG89 zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C auf einer Schüttelplattform bei 150 rpm inkubiert. Nach 1,5 h wurden jeweils 0,5 % Mannitol (REG19) und 0,5 % Cellibiose (REG89) zugegeben und die Kulturen weiter inkubiert. Die Kontrollen blieben ohne Zuckerzugaben. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm in Abständen von jeweils 1,5 h verfolgt. Aufgetragen sind die Mittelwerte der OD<sub>600</sub> aus drei unabhängigen Experimenten.

Ebenso wie im Stamm REG19 wurde im Stamm REG89 das native *comK* Gen deletiert. Dafür wurde der Stamm REG89 mit dem Plasmid pREG13 ( $\Delta comK$ ) transformiert (REG159). Die Deletion des nativen *comK* Gens in REG159 führte nur zu einer geringfügigen Abnahme der Transformationsrate ( $3,9 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur bei REG159 im Vergleich  $4,8 \times 10^4$  Kolonien pro ml Kultur bei REG89). Die Transformationsrate sank gerade einmal um 20 %. Interessanterweise entstanden auch ohne Induktion  $7,3 \times 10^3$  Kolonien pro ml Kultur (Abbildung 49).

Ausgehend von REG1 wurde ein Stamm konstruiert, bei dem das native Gen *comK* inklusive des Promotors  $P_{comK}$  durch  $P_{licB-comK-comS}$  ersetzt wurde (REG154). Dafür wurden mittels zweier PCR-Reaktionen ca. 700 bp große flankierende Regionen des *comK* Gens aus dem Stamm *B. subtilis* 168 mit den Oligonukleotiden s10101 und s10102 sowie s10103 und s10104 amplifiziert. Diese beiden Amplifikate wurden über eine 3-Fragment Ligation und die Schnittstellen *SphI* und *EagI* in das Plasmid pJOE4786 integriert (pREG80). Die Sequenz aus  $P_{licB-comK-comS}$  wurde mit den Oligonukleotiden s10105 und s10106 und der Matrize pREG89 amplifiziert und über die Schnittstelle *EagI* zwischen die beiden Fragmente in pREG80 eingefügt (pREG84). REG1 wurde mit pREG84 transformiert und die Mutante, bei der das Gen *comK* und

sein nativer Promotor durch die  $P_{licB-comK-comS}$  Kasette ersetzt war, identifiziert (REG154). Dies erfolgte über die Spectinomycin Selektion und die Gegenselektion mit Mannose sowie einer Kolonie-PCR.



**Abbildung 49: Transformationsraten nach Induktion der Kompetenz durch Cellibiose von REG89, REG154 und REG159.** Die Stämme REG89 ( $hisI-P_{licB-comK-comS-yvcA}$ ), REG159 ( $hisI-P_{licB-comK-comS-yvcA}, \Delta comK$ -nativ) und REG154 ( $P_{comK-comK}:P_{licB-comK-comS}$ ) wurden in LB-Medium (mit und ohne Cellibiose Zugabe) angezogen und mit 100 ng pWAL275 in Dimerkonformation transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Die Stämme REG159 und REG154 zeigten bei der Transformation mit dem Plasmid pWAL275 in Dimerkonformation eine annähernd gleiche Transformationsrate. Der Stamm REG159 wies  $3,9 \times 10^4$  Kolonien pro ml auf und der Stamm REG154  $4,3 \times 10^4$  Kolonien pro ml.

Ein größerer Unterschied war lediglich in der Anzahl an Transformanten zu sehen, wenn die Zellen nicht mit Cellibiose induziert wurden. Hier bildete der Stamm REG154 mit  $1,4 \times 10^4$  Kolonien pro ml im Vergleich zum Stamm REG159 mit  $0,7 \times 10^4$  Kolonien pro ml eine deutlich geringere Anzahl an Transformanten (Abbildung 49). Dies könnte an der unterschiedlichen Umgebung der  $P_{licB-comK-comS}$  Kasette liegen. Das Wachstum der Stämme REG159 und REG154 zeigte, dass die Deletion des nativen  $comK$  Gens zu einer Wachstumsverbesserung führte. Somit war in diesen Stämmen zu beobachten, dass eine hohe Transformationsrate erhalten blieb, auch wenn das Wachstum nicht gehemmt war (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Wachstum der Stämme REG89 (*hisI-P<sub>licB</sub>-comK-comS-yvcA*), REG159 (*hisI-P<sub>licB</sub>-comK-comS-yvcA*,  $\Delta$ *comK* -nativ) ( $\Delta$ *comK* -nativ) und REG154 (*P<sub>comK</sub>-comK::P<sub>licB</sub>-comK-comS*) bei der Anzucht und Induktion zur Kompetenz sowie während der Transformation.** Die Stämme wurden 1,5 h in LB-Medium bei 37 °C angezogen und anschließend mit 0,5 % Cellibiose versetzt. Folgend wurden die Kulturen für weitere 1,5 h auf einem Schüttler inkubiert (TK) und nach dem Waschen mit 100 ng pWAL275 Plasmid-DNA versetzt. Es folgte weiter eine Inkubation von 1 h auf dem Roller (Rollern). Das Wachstum wurde über die optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Stamm	REG89		REG159		REG154	
Induktion	Clb	/	Clb	/	Clb	/
TK	0,8	1,47	1,18	1,28	1,33	1,26
Rollern	0,68	1,09	1,2	1,35	1,09	1,31

### 3.6 Deletion von chromosomalen Genen mit der Gibson Assembly<sup>®</sup> Methode

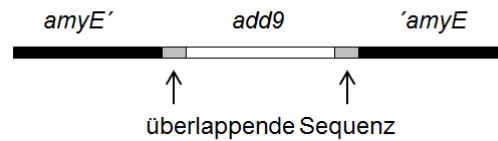
Üblicherweise werden chromosomale Gene oder auch größere Regionen deletiert, indem flankierende Sequenzen von mehreren hundert Basenpaaren der Zielsequenz mittels PCR amplifiziert werden. Anschließend werden die amplifizierten Fragmente Strang aufwärts und -abwärts von einer Antibiotikaresistenz Kasette in einen *E. coli* Vektor eingefügt. Dieser Vektor kann sich in *B. subtilis* nicht selbst replizieren, aber auf Grund der homologen Abschnitte in das Chromosom integrieren. Dabei wird die Zielregion durch das Antibiotika Resistenzgen nach einem Doppelcrossover ersetzt. In einem Stamm mit einer hohen Transformationsrate könnten solche Deletionen ohne ein Plasmid als Vektor durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass nur eine DNA-Sequenz bestehend aus den flankierenden Regionen und dem Antibiotika Resistenzgen transformiert wird. Auf Grund der hohen Transformationsrate von REG19 sollte diese Methode anhand der Deletion des Amylase Gens (*amyE*) in REG19 erprobt werden.

Das Spectinomycin Resistenzgen wurde mit den Oligonukleotiden s10448 und s10449 sowie pMW168 als Matrize mittels einer PCR amplifiziert. Für die Amplifikate der *amyE*-flankierenden Regionen (ca. 700 bp) wurde *B. subtilis* 168 als Matrize verwendet. Für die stromaufwärts liegende Sequenz wurde die Oligonukleotide s10446 und s10447 und für die stromabwärts liegende Sequenz die Oligonukleotide s10450 und s10451 verwendet. Diese amplifizierten chromosomalen Fragmente wiesen jeweils an ihren Enden 20 bp lange Überlappungen mit dem Spectinomycin Resistenzgen auf. Daher konnten alle drei Fragmente gerichtet mit Hilfe des Gibson Assembly<sup>®</sup> Kit (New Eng-



land BioLabs<sup>®</sup>, Frankfurt, Germany) ligiert werden. Der Ligationsansatz wurde anschließend als Donor-DNA für die Transformation in REG19 genutzt (Abbildung 50).

Monomer:



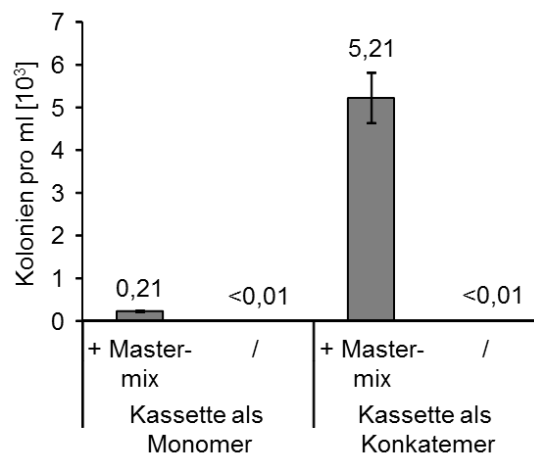
Konkatermer:



**Abbildung 50: Schematische Darstellung der Konstruktion des Monomers und Konkatermers mittels Gibson Assembly zur Inaktivierung des *amyE* Gens.** Für das Monomer wurden die beiden *amyE*-flankierenden Regionen mit Hilfe von zwei überlappenden Sequenzen an das Spectinomycin Resistenzgen angehängt. Das Konkatermer unterscheidet sich darin, dass die beiden *amyE*-flankierenden Regionen ebenfalls überlappende Sequenz zueinander haben.

Für die Transformation wurde der Stamm mit der LB-Methode kompetent gemacht. Es wurden etwa 200 spectinomycinresistente Transformanten pro Milliliter erhalten (Abbildung 51). Die Transformationsrate war jedoch viel geringer im Vergleich zu einer Transformation mit Plasmid- oder chromosomaler DNA. Zur Kontrolle wurde anschließend die Amylasefunktion getestet, indem die Kolonien auf LB Agar Platten mit 1 % Stärke überimpft wurden. Durch Jodfärbung konnte gezeigt werden, dass alle spectinomycinresistenten Kolonien keine Amylase mehr produzierten.

Wie eben beschrieben, können Deletionen ohne die Verwendung von Plasmiden erzeugt werden. Die Effizienz ist jedoch gering. Bei der Gibson Assembly Methode werden zunächst doppelsträngige Fragmente mit einer Nuklease behandelt und einzelsträngige Enden generiert. Dadurch können sich komplementäre Sequenzen anlagern. Im zweiten Schritt werden die Lücken mit einer DNA Polymerase aufgefüllt. Zum Schluss werden die Fragmente miteinander ligiert. Dadurch werden sie vor dem weiteren Abbau durch die, in dem Gibson Assembly Mastermix enthaltenen, Nukleasen geschützt. Da die beiden äußeren Enden der drei ligierten Fragmente angreifbar für die Nukleaseaktivität vorliegen, wurde vermutet, dass dies der Grund für die geringe Transformationseffizienz sein könnte.

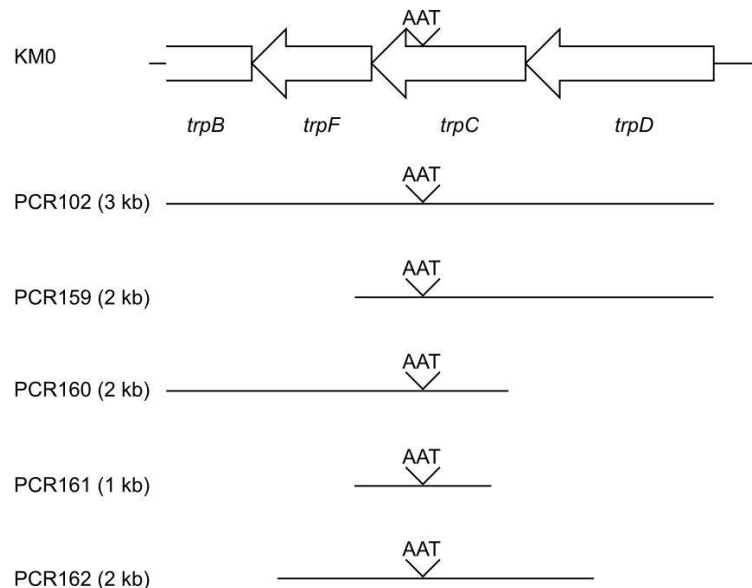


**Abbildung 51: Transformationsrate von REG19 mit Gibson Assembly generierter DNA.** Der Stamm REG19 wurde mit der LB-Methode kompetent gemacht, mit 10  $\mu$ l des entsprechenden Gibson Assembly Mixes als Donor-DNA transformiert und auf Platten mit Spectinomycin selektioniert. Als Kontrolle wurde der Mastermix bei der Gibson Assembly Reaktion weggelassen. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Das Experiment wurde so verändert, dass die Kassette aus den flankierenden Regionen und dem Antibiotika Resistenzgen als Konkatermer vorlag (Abbildung 50). Dafür wurde das Spectinomycin Resistenzgen identisch zu dem vorangegangenen Versuch mit den Oligonukleotiden s10448 und s10449 sowie pMW168 als Matrize mittels einer PCR amplifiziert. Die Amplifikate der *amyE*-flankierenden Regionen (ca. 700 bp) wurden jedoch mit neuen Oligonukleotiden amplifiziert. Das Oligonukleotid s10446 wurde durch das Oligonukleotid s10453 ersetzt sowie s10451 durch s10452. Die Oligonukleotide unterschieden sich darin, dass sie sich ebenfalls an den äußeren Enden in 20 bp lange Sequenzen überlappen. Die drei Fragmente wurden wie oben beschrieben mit dem Gibson Assembly Mix behandelt und damit REG19 transformiert. Dabei wurde mit 5210 Kolonien pro ml Kultur (Abbildung 51) eine 25-fache Steigerung der Transformationsrate im Vergleich zu dem Versuch mit dem Monomer erreicht. Die spectinomycinresistenten Kolonien wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit zur Amylaseproduktion getestet. Dabei zeigte sich jedoch, dass nur 80 % der Kolonien keine Amylase mehr produzieren.

### 3.7 Einfluss der Länge von DNA-Fragmenten auf die homologe Rekombination (HR)

Für die in Kapitel 3.6 beschriebene chromosomale Deletion durch einen Austausch mit einem Antibiotika Resistenzgen wurden jeweils ca. 700 bp lange flankierende Sequenzen verwendet. Um zu sehen, ob die Länge der homologen Fragmente einen Einfluss auf die Rekombination mit dem Chromosom hat, wurden verschieden lange, zu *trpC* homologe Fragmente erzeugt und damit REG19 transformiert. Zum Vergleich wurde chromosomale DNA von dem tryptophanprototrophen *B. subtilis* Stamm KM0 verwendet. KM0 war zuvor generiert worden, indem die drei im *trpC* Gen von *B. subtilis* 168 fehlenden Basenpaare (TAA) eingefügt worden waren. Darüber wurde ein *trpC*<sup>+</sup> Gen für eine funktionsfähige Indol-3-Glycerin-Phosphat Synthetase erzeugt.

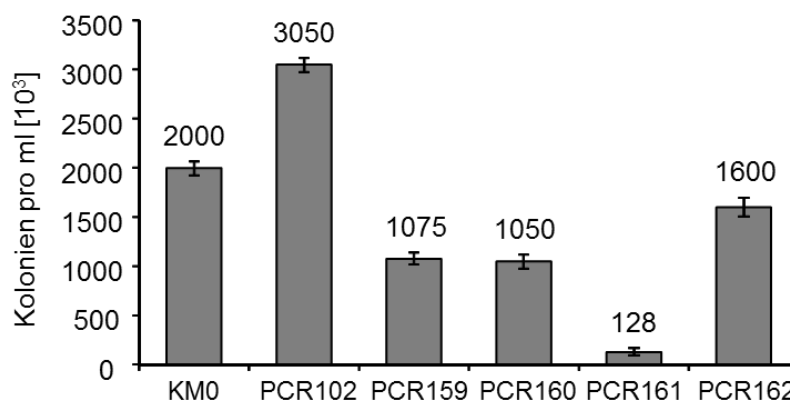


**Abbildung 52:** Ausschnitt aus dem *trp*-Operon. Lage der drei, in das *trpC* Gen von *B. subtilis* 168 eingefügten Basen und Fragmentlängen, die aus dem *trp*-Operon von *B. subtilis* KM0 über PCR amplifiziert wurden.

Ausgehend von der DNA aus dem KM0 Stamm wurden durch PCR-Reaktionen verschieden lange Fragmente aus der *trpC*<sup>+</sup> Region amplifiziert. Für das PCR102 Produkt wurden die Oligonukleotide s9667 und s9668 verwendet und ein Fragment mit einer Größe von 3 kb erzeugt. Dabei waren die eingefügten drei Basenpaare in der Mitte des Fragments. Die Produkte PCR159 (Oligonukleotide s9667 und s10681), PCR160 (Oligonukleotide s10680 und s9668) und PCR162 (Oligonukleotide s10682 und s10683) waren 2 kb lang, unterschieden sich aber in der Position der eingefügten Basenpaare (TAA) in das *trpC* Gen. Bei dem PCR159 Fragment lagen diese 500 bp vom

Anfang des Fragments entfernt, im PCR160 Fragment 500 bp vom Ende und in dem PCR162 Fragment genau in der Mitte. Des Weiteren wurde auch die PCR161 (Oligonukleotiden s10680 und s10681) mit einer Fragmentlänge von 1 kb erzeugt, das die drei eingefügten Basenpaare in der Mitte des Fragments hatte (Abbildung 52). REG19 wurde mit diesen verschiedenen PCR-Fragmenten aus der KM0-DNA und mit chromosomaler DNA von KM0 transformiert und die Transformanten auf Agarplatten mit Minimal-Glucose-Medium ohne Tryptophan selektioniert.

Die Ergebnisse der Transformation mit diesen PCR Fragmenten und der chromosomalen DNA sind in Abbildung 53 dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl die Länge des PCR Produktes als auch die Position der drei Basen (TAA), um das das PCR Fragment erweitert ist, ausschlaggebend waren. Die Transformation mit dem 3 kb großen PCR102 Fragment ergab mit Abstand die meisten Kolonien ( $3,05 \times 10^6$  Kolonien pro ml Kultur). Im Vergleich dazu kam es mit dem PCR162 Fragment zu einer um 47 % verringerten Transformationsrate ( $1,6 \times 10^6$  Kolonien pro ml Kultur) und mit dem PCR161 Fragment sank die Rate sogar um 95,8 % ( $1,28 \times 10^5$  Kolonien pro ml). Der Vergleich der Transformationsraten, die mit den PCR159-, PCR160- und PCR162 Fragmenten erreicht wurden, zeigte, dass die Position der zusätzlichen Basenpaare ebenfalls eine Auswirkung auf das Ergebnis hatte. Lag diese in der Mitte, war die Zahl der Transformanten am höchsten. Lag diese versetzt in Richtung Anfang oder Ende, nahm die Zahl der Transformanten im Vergleich zur Mitte um ein Drittel ab.

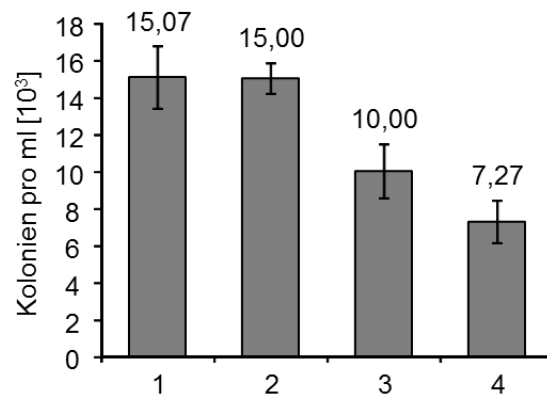


**Abbildung 53: Transformationseffizienz von REG19 mit unterschiedlich langen PCR-Fragmenten aus der *trpC*<sup>+</sup> Region von *B. subtilis* KM0 als Donor-DNA.** Der REG19 Stamm wurde mit der LB-Methode kompetent gemacht und mit jeweils 600 ng der Fragmente PCR102, PCR159, PCR160, PCR161 und PCR162 transformiert. Als Kontrolle wurde der Stamm mit 3  $\mu$ g der chromosomalen DNA des KM0 Stammes transformiert. 600 ng der PCR-Fragmente sowie 3  $\mu$ g der chromosomalen DNA wurden gewählt, da dies jeweils die gesättigte Menge an DNA für die Transformation darstellte. Angegeben sind

die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.8 Kotransformationsversuche mit REG19

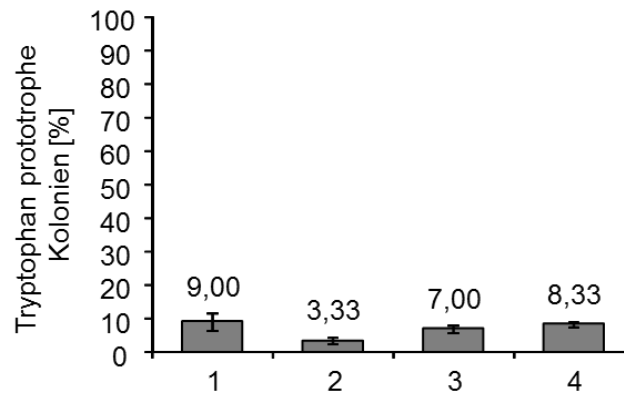
Eine Kotransformation bezeichnet eine gleichzeitige Transformation von zwei oder mehr Genen. Für eine erfolgreiche Kotransformation sollten die Gene auf dem gleichen DNA-Fragment und in räumlicher Nähe liegen. Umso näher die Gene beieinander liegen, umso höher sollte die Kotransformationsrate sein. Dies wurde in der klassischen Genetik für Genkartierungen in *B. subtilis* benutzt. Gleichzeitig musste durch experimentelle Bedingungen und statistische Methoden sichergestellt werden, dass die Aufnahme zweier Gene nicht durch zwei verschiedene Fragmente zustande kam (Hartwell, 2004; Bettinger & Young, 1975). Wie bisher gezeigt werden konnte, ist die Transformationsrate in dem Stamm REG19 gegenüber dem Wildtyp deutlich gesteigert. Dies könnte dazu führen, dass zwei DNAs in einen Stamm gebracht werden können, von denen eine nicht selektionierbar ist. Als Beispiel bot sich die Transformation eines Plasmids zusammen mit einem chromosomalen DNA Fragment an. Die Plasmid-DNA wird vermutlich ebenso effizient aufgenommen, wie die chromosomale DNA und kann über eine Antibiotikaresistenz leicht selektioniert werden. Die Transformationsrate ist auf Grund der ineffizienten Etablierung geringer. Ein DNA Fragment mit einem defekten *trpC* Gen wird mit hoher Effizienz mit dem Chromosom rekombiniert, kann aber nicht direkt selektioniert werden. Eine Kombination von Plasmid-DNA mit einem DNA Fragment würde das Problem der Nichtselektionierbarkeit des defekten *trpC* Gens lösen. Um das Plasmid darauffolgend wieder aus der Zelle zu entfernen, kann man einen temperatursensitiven Vektor verwenden.



**Abbildung 54: Gleichzeitige Transformation von REG19 mit Plasmid und chromosomaler DNA.**

Der REG19 Stamm wurde mit der LB-Methode kompetent gemacht und gleichzeitig mit pWAL275 in Dimerkonformation und einem 3 kb langen Fragment transformiert, das aus der PCR mit *B. subtilis* KM0 (PCR102 DNA, siehe Kapitel 3.7) erhalten wurde. Bei (1) wurden 200 ng Plasmid- und 600 ng PCR-DNA verwendet. Bei (2) wurden 200 ng Plasmid- und 300 ng PCR-DNA, bei (3) 100 ng Plasmid- und 600 ng PCR-DNA und bei (4) 50 ng Plasmid- und 600 ng PCR-DNA verwendet. In der Abbildung sind die Anzahl an kanamycinresistenten Transformanten aus den jeweiligen Ansätzen aufgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen pro ml aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Da hier erst einmal nur das Potential dieser Methode getestet werden sollte, wurden für die Kotransformation das Plasmid pWAL275 in Dimerkonformation sowie das *trpC*<sup>+</sup> Gen aus dem Stamm KM0 verwendet. Dafür wurde ein 3 kb langes PCR-Fragment mit den Oligonukleotiden s9667 und s9668 amplifiziert, wobei DNA des Stammes *B. subtilis* KM0 als Matrize diente. Nach der Transformation des REG19 Stammes mit den beiden Donor DNAs wurden die Transformanten zunächst auf LB-Platten mit Kanamycin selektiert (Plasmidtransformation) und anschließend 100 der entstandenen Kolonien auf das Wachstum in Minimal-Glucose Agarplatten ohne Tryptophan (Kotransformation) getestet.



**Abbildung 55: Kotransformationsrate von REG19 bei gleichzeitiger Zugabe von Plasmid und chromsomal DNA.** Nach der Selektion auf Kanamycin wurden resistente Kolonien auf die Aufnahme des *trpC*<sup>+</sup> positiven Markers auf Minimal-Glucose Medium ohne Tryptophan getestet. Angegeben ist der Prozentsatz an Tryptophan prototrophen Kolonien, die bei den vier Experimenten erhalten wurden. Bei (1) wurden 200 ng Plasmid- und 600 ng PCR DNA verwendet. Bei (2) wurden 200 ng Plasmid- und 300 ng PCR-DNA, bei (3) 100 ng Plasmid- und 600 ng PCR-DNA und bei (4) 50 ng Plasmid- und 600 ng PCR-DNA verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte der Koloniezahlen in Prozent aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Es wurden unterschiedliche DNA Mengen getestet, um die effizienteste Kotransformationsrate zu erhalten. Im ersten Versuch (1) wurden 200 ng Plasmid-DNA und 600 ng PCR-Fragmente verwendet. Im zweiten Versuch (2) wurden 200 ng Plasmid-DNA und 300 ng PCR-Fragmente; im dritten Versuch (3) 100 ng Plasmid-DNA und 600 ng PCR-Fragmente und im vierten Versuch (4) 50 ng Plasmid-DNA sowie 600 ng PCR-Fragmente verwendet. Die Transformationsraten mit der Plasmid-DNA zeigten ebenfalls einen Sättigungsbereich ab 100 ng. Erst bei 50 ng Plasmid DNA reduzierte sich die Anzahl an Transformanten um 50 %. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass durch die zusätzliche DNA aus der PCR nur eine minimale Beeinflussung vorlag (Abbildung 54). Dennoch war die Kotransformation gering und lag unter 10 % der Zellen, die erfolgreich das Plasmid etabliert hatten. Bei höheren Mengen an amplifizierter DNA wurden durchschnittlich mehr *trpC*<sup>+</sup> positive Kolonien erhalten, nahezu unabhängig von der Menge an Plasmid DNA (Abbildung 55).

## 4 Diskussion

### 4.1 Transformation bei *Bacillus subtilis* 168: Entwicklung einer optimierten Transformationsmethode

Das Bakterium *B. subtilis* zeichnet sich unter anderem durch seine natürliche Kompetenz aus. Diese ermöglicht den Zellen freie DNA aufzunehmen. Bakterien ohne natürliche Kompetenz, wie z.B. *E. coli*, können nur durch eine spezielle Behandlung künstlich in einen kompetenten Zustand versetzt werden. Die natürliche Kompetenz erleichtert sowohl die genetische Veränderung der Zellen in der Forschung, als auch die Optimierung eines Stammes für die Produktion. J. Spizizen und C. Anagnostopoulos entwickelten im Jahre 1961 eine Transformationsmethode, bei der die Zellen bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen und daraufhin in ein aminosäureärmeres Medium überführt werden (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Hierdurch wird die natürliche Kompetenz aktiviert. Da in der Übergangsphase von dem exponentiellen in das stationäre Wachstum die Zellen von *B. subtilis* unterschiedliche Subpopulationen bilden, wird nur ein geringer Teil der Zellen kompetent. Spizizen und Anagnostopoulos beschrieben, dass 1-3,5 % der Zellen in einer Kultur kompetent werden (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Bis heute wurde die Kompetenz intensiv untersucht und in der Literatur sind Kompetenzwerte von 5-20 % beschrieben (Haijema *et al.*, 2001; Turgay *et al.*, 1997; Leisner *et al.*, 2008; Draskovic & Dubnau, 2005). Die Transformation ist mit der Methode von Spizizen und Anagnostopoulos möglich, ist aber aufgrund der geringen Rate nicht konstant erfolgreich. Daher haben bereits verschiedene Arbeitsgruppen versucht, die Transformationsrate zu steigern. Dabei wurde ein weiteres *comK* bzw. *comS* Gen sowohl in das Chromosom, als auch auf Plasmiden in die Zellen eingebracht und mittels verschiedener induzierbarer Promotoren exprimiert. Hierbei konnte die Kompetenz einerseits verbessert werden, das Spizizen Minimalmedium durch das LB Medium ersetzt und die Methode zeitlich verkürzt werden (Nijland *et al.*, 2010; Hahn *et al.*, 1996; Zhang & Zhang, 2011; Duitman *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1996). Dabei wurde meist die Steigerung der Kompetenz über die Zahl an Komplexen zur DNA Aufnahme definiert.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Transformationsrate zu verbessern. Der Unterschied lag jedoch darin, dass nicht nur ein weiteres *comK* Gen mit einem induzierbaren Promotor exprimiert wurde, sondern zusätzlich verschiedene weitere für die Kompetenz wich-



tige Gene mit exprimiert wurden. Dabei wurde z.B. sowohl *comK*, *comS* oder *dprA* untersucht, als auch Kombinationen aus *comK* mit *comS* bzw. *dprA*. Die Transformationsrate wurde über die Anzahl an Kolonien pro Milliliter bestimmt, die nach der Transformation eine Antibiotikaresistenz aufwiesen. Die Expression der Gene *comK*, *comS* und *dprA* einzeln oder in Kombination bestätigte, dass ComK alleine bereits zu einer Steigerung der Transformationsrate führte. Eine weitere Steigerung der Transformationsrate war mit einer Kombination aus *comK* und *comS* möglich. Dies ist damit zu erklären, dass neben der gesteigerten ComK Konzentration der Proteinabbau über ComS verhindert wird (Turgay *et al.*, 1998; Prepiak & Dubnau, 2007). Demzufolge kommt es zu einer gesteigerten ComK Menge in der Zelle, wodurch sich die ComK Proteine zu einem Tetramer zusammen lagern können. Das Tetramer wiederum ist in der Lage, die eigene Expression zu initiieren, indem es an seinen eigenen Promotor ( $P_{comK}$ ) bindet (Hamoen *et al.*, 2003a). Aus der Mannitol initiierten und der daraus möglichen *comK* Expression mittels dem nativen Promotor folgt eine Steigerung der ComK Menge in der Zelle. Diese kann in den meisten Zellen den Schwellenwert der Kompetenzaktivierung überschreiten. Es zeigte sich zudem, dass nur die Menge an ComK, die auch zu einem Überschreiten des Schwellenwertes führt, die Zellen kompetent werden lässt. Diese wurde erreicht, wenn der Stamm REG19 für 1,5 h mit 0,5 % Mannitol (w/v) induziert wurde. Dieses Phänomen könnte damit erklären werden, dass eine zu starke ComK Expression zur Bildung von Proteinaggregaten (*inclusion bodies*) führt. Andererseits ist bekannt, dass kompetente Zellen nach ihrer DNA Aufnahme nur dann eine Kolonie ausbilden können, wenn die ComK Menge in der Zelle wieder abgesunken ist (Leisner *et al.*, 2008). Möglicherweise wird dieses Absenken auf ein geringes Niveau in den Zellen nicht erreicht, wenn die ursprüngliche ComK Konzentration zu hoch war. Somit ist eine bestimmte ComK Menge notwendig für eine hohe Transformationsrate.

Der Stamm REG19 (*B. subtilis* 168 +  $P_{mliA-comK}$ ) zusammen mit dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll (LB-Methode) (Kapitel 3.1.5) führte zu einer deutlich gesteigerten Zahl an Transformanten pro ml Kultur im Vergleich zu *B. subtilis* 168, wenn dieser mit der Methode nach Anagnostopoulos und Spizizen in MG-Medium kompetent gemacht wurde. Der Stamm REG6 ( $P_{mliA-comK}$ ) zeigte bereits eine 4,6-fach gesteigerte Zahl an Transformanten pro ml Kultur im Vergleich zu *B. subtilis* 168 (Abbildung 17) und REG19 eine weitere Steigerung um das 1,5-fache im Vergleich zu REG6 (Abbildung 18). Um die Transformationsrate genauer charakterisieren zu können, wurde die Zahl an Kolonien pro gesamt ausplattierten Zellen ermittelt. Dabei zeigte sich,

dass LB-Methode zu einer Steigerung führte. Die Rate war jedoch bei beiden Methoden sehr gering. Mit der LB-Methode nahm 1 % der Zellen chromosomale DNA auf und bildete Kolonien aus. Im Falle der Plasmid-DNA waren es gerade einmal 0,008 % der Zellen (Tabelle 22). Um dieses Ergebnis detaillierter betrachten zu können, wurde die Zahl an kompetenten Zellen mittels Fluoreszenz bestimmt. In den Zellen der Stämme REG47 und REG48 befindet sich das Gen *eGFP* unter der Kontrolle des  $P_{comG}$  Promotors. Dieser wird aktiviert, sobald ComK an ihn bindet. Dabei zeigte sich, dass wenn die Zellen im MG-Medium angezogen wurden, nur in 7,8 % der Zellen ein fluoreszierendes Signal vorhanden war. Da bei *B. subtilis* 168 ComK nur im kompetenten Zustand an  $P_{comK}$  bindet, wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden Signal als kompetent angesehen. Dies geschah dagegen in 62 % der Zellen, wenn die Zellen in LB-Medium mit Mannitol angezogen wurden (Tabelle 23). Um auch die Zahl an Zellen mit einem DNA-Aufnahme Komplex zu bestimmen, wurde eGFP an das C-terminale Ende von ComGA fusioniert. Das *comGA* Gen selbst ist im Operon *comG* (DNA-Aufnahmekomplex) lokalisiert, das wiederum von ComK reguliert wird. ComGA ist der Hauptbestandteil des Pseudopilus. Durch die Kopplung mit eGFP wird auch die Lage des DNA-Aufnahmekomplexes sichtbar. Die Zahl der Zellen mit DNA-Aufnahmekomplexen entsprach der Zahl an fluoreszierenden Zellen. Interessanterweise zeigten 45 % der Zellen, die in LB-Medium angezogen und mit Mannitol induziert waren, einen DNA-Aufnahmekomplex an beiden Zellpolen. Wenn die Zellen in MG-Medium angezogen wurden, wiesen nur 3,9 % der Zellen einen DNA-Aufnahmekomplex an beiden Zellpolen auf (Abbildung 31). Zusammenfassend bedeutet dies, dass die LB-Methode zusammen mit der Koexpression von *comK* und *comS* unter dem Mannitolpromotor zu einer deutlichen Steigerung an kompetenten Zellen führt. Zudem ist die DNA Aufnahme wahrscheinlich verbessert, indem die meisten Zellen an beiden Zellpolen einen DNA-Aufnahmekomplex aufweisen. Unklar jedoch ist, ob sich nur ein Komplex an einem Zellpol befindet oder mehrere nebeneinander. Nichts desto trotz war nur ein sehr geringer Teil dieser kompetenten Zellen in der Lage Kolonien auf Agar-Platten zu bilden, nachdem DNA zugegeben wurde. Weiterhin war es von großer Bedeutung, ob es sich bei der zugegebenen DNA um chromosomale DNA oder Plasmid-DNA handelte.

## 4.2 Beeinflussung der Transformation

Um die Transformation in REG19 genauer charakterisieren zu können, wurden verschiedenste Faktoren im Regulationsnetzwerk der Kompetenzentwicklung deletiert und die Auswirkung auf die Transformationsrate untersucht. Eine ähnliche Arbeit wurde bereits von Hahn *et al.* (1996) durchgeführt. Dabei wurde jedoch nicht die Menge an kolonienbildenden Transformanten bestimmt, sondern der Einfluss von für die Kompetenz wichtigen Genen über die ComG-Menge mittels eines  $\beta$ -Galactosidase Assays untersucht. Dass sich diese Funktionen jedoch nicht mit der allgemeinen Transformierbarkeit bzw. Menge an Kolonien vergleichen lässt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die Bistabilität einer Kultur in der stationären Wachstumsphase ist der zentrale Faktor in der Kompetenzoptimierung. Einerseits ist die Zelldifferenzierung essentiell für die Kompetenzentstehung, andererseits führt dies in einer bistabilen Kultur zu unterschiedlich differenzierten Zellen (Endosporen bildenden Zellen, Biofilm bildende Zellen sowie Zellen die Enzyme und Antibiotika sekretieren) (Lopez *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2008). Eine optimierte Transformationskultur sollte dagegen nur aus kompetenten Zellen bestehen. Um dies zu erreichen, wurden Faktoren deletiert, die einen Einfluss auf die Bistabilität haben. Der wichtigste Faktor innerhalb der Bistabilität ist Spo0A~P. In Abhängigkeit von der Menge an Spo0A~P kommt es zur Sporulation, Kompetenzentstehung (Mirouze *et al.*, 2012), Biofilmbildung, Toxin- oder Antibiotikaproduktion etc. (Shafikhani *et al.*, 2002).

In der Literatur zeigte sich, dass *spo0A* Mutanten kaum transformierbar sind (Young & Spizizen, 1961). Begründet ist dies damit, dass eine geringe Spo0A~P Konzentration die Expression von *comK* aktiviert und gleichzeitig die Repression durch Abschalten der *abrB* Expression aufhebt (Mirouze *et al.*, 2012). So führte auch die Deletion des *spo0A* Gens im Stamm REG19 zu einer verminderten Transformationsrate. Die Abnahme um 30 % war jedoch geringer als erwartet (Abbildung 36A). Dieses Ergebnis kann damit erklärt werden, dass durch die Expression von *comK* und *comS* über den Mannitol Promotor die Aktivierung des nativen *comK* Promotors durch geringe Spo0A~P Mengen sowie die Repression durch AbrB umgangen werden können. Weiterhin zeigte dieses Ergebnis, dass die Sporulation im Stamm REG19 entfernt werden kann, ohne dass die Kompetenzbildung stark vermindert wird. Dies ist wichtig, da die Sporulation ein störender Faktor bei der Nutzung des Stammes im Labor und bei der Produktion ist. Eine andere Möglichkeit um die Sporulation zu unterdrücken, kann über

eine Verhinderung der Phosphorylierung von Spo0A erreicht werden. Da Spo0A über ein Phosphorelay-System phosphoryliert wird (Burbulys *et al.*, 1991; Perego & Branigan, 2001; Jian *et al.*, 2000), wurden verschiedene Komponenten (Spo0B, KinB und KinC) entfernt, wobei nur die Deletion von *kinB* zu einer deutlichen Absenkung der Transformationsrate führte (Abbildung 36B). Die Kinasen KinC als auch KinB stehen am Anfang des Phosphorelay-Systems zusammen mit drei weiteren Kinasen, von denen KinA gemäß der Literatur die höchste Aktivität zeigt (LeDeaux *et al.*, 1995). Es ist daher nicht erklärbar, warum die Transformationsrate gerade bei der *kinB* Deletion stärker absinkt, als zum Beispiel bei der Deletion von *spo0A*. Die gleichbleibende Transformationsrate nach der *spo0B* Deletion überraschte, da bisher davon ausgegangen wurde, dass Spo0A~P nur von Spo0B phosphoryliert wird. Es gibt Hinweise, die dies in Frage stellen und zumindest eine direkte Phosphorylierung von Spo0A durch KinC postulieren (Quisel *et al.*, 2001). Spo0E, das Spo0A dephosphoryliert, wird wiederum von FtsH degradiert. Deletionsmutanten von *ftsH* zeigen Defekte in der Biofilmbildung, in der Zellteilung und eine deutlich reduzierte Sporulationsfähigkeit (Zellmeier *et al.*, 2003). In REG19 führte die Deletion zu einem absoluten Verlust der Transformierbarkeit. Dies kann nicht mit der Degradation von Spo0E begründet werden, da ja gezeigt wurde, dass Spo0A ohnehin in REG19 nur einen geringen Einfluss auf die Transformationsrate hat. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass dies durch die Veränderung von anderen wichtigen Zellfunktionen verursacht wurde, die durch den Ausfall dieser ATP-abhängigen Metalloprotease entstanden. In Übereinstimmung damit konnte für REG19 Zellen mit der *ftsH* Deletion ein stark vermindertes Wachstum beobachtet werden.

Für den geregelten Übergang der Kultur in die stationäre Wachstumsphase ist das Regulator Protein AbrB essentiell (Perego *et al.*, 1988; Banse *et al.*, 2008). Neben dieser Aufgabe ist es, mit seiner Bindung an den *comK* Promotor, ein wichtiger Repressor bei der Kompetenzentwicklung. Nun stellte sich die Frage, ob eine Deletion des *abrB* Gens, das sich durch eine Repressoraktivität auszeichnet, zu einer Verbesserung der Transformationsrate führt oder aber die Zellen ohne die AbrB Regulation zu früh und unkontrolliert in die stationäre Wachstumsphase übergehen. Die zweite Vermutung bestätigte sich. Die Transformationsrate war deutlich vermindert und das Wachstumsverhalten verändert (Abbildung 33A). Der *abrB* deletierte Stamm zeigte ein ungewöhnlich schnelles Wachstum, sowohl in der 3-stündigen Wachstumsphase während der Induktion der Kompetenz, als auch beim einstündigen Rollern nach der DNA Zugabe (Tabelle 25).

Somit ist das Regulatorprotein, trotz der Repression von *comK*, wichtig für die Kompetenzausbildung in REG19. Ein weiterer in der Bistabilität von *B. subtilis* involvierter Faktor ist DegU. Der Antwortregulator zeichnet sich darüber aus, dass er in der nicht phosphorylierten Form initiiierend auf die *comK* Transkription wirkt (Hamoen *et al.*, 2000), während er in der phosphorylierten Form vor allem die Sekretion extrazellulärer Proteine aktiviert. Hahn *et al.* (1996) stellten bereits über eine transkriptionelle Fusion mit dem Reporter gen *lacZ* ( $\beta$ -Galaktosidase) fest, dass DegU nicht notwendig ist, wenn die Kompetenz z.B. durch einen anderen Promotor reguliert wird ( $P_{xyl-comK}$ ). In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass in einem *degU* defizienten REG19 Stamm die Transformationsrate sogar erhöht ist (Abbildung 33A). Dies zeigt, dass die durch DegU erleichterte Bindung von ComK an seinen Promotor nicht mehr notwendig ist. Die positive Wirkung der Deletion könnte damit erklärt werden, dass DegU~P einen negativen Einfluss auf die Kompetenz ausübt. Dabei führt es die Zellen weg von der Kompetenz und hin zu einem anderen Differenzierungsprozess. DegU ist zudem in ein Regulationsnetzwerk aus SlrR, SinR und SinI integriert, das ebenfalls den Wachstumsübergang der Zelle kontrolliert (Ogura *et al.*, 2014). Deletionen dieser Faktoren zeigten einerseits eine indirekte Wirkung auf die Kompetenz, indem die Transformationsrate gesteigert ( $\Delta sinI$ ) bzw. vermindert ( $\Delta slrR$ ) war, während die Deletion von *sinR* keine Auswirkung zeigte. In diesem Regulationsnetzwerk ist zu beachten, dass Deletionen der einzelnen Faktoren zu einer Proteinmengenvariabilität der anderen Faktoren in dem Regulationsnetzwerk führen kann. Vor allem ist eine erhöhte SinR Menge ausschlaggebend für das Ergebnis. Im Detail bedeutet dies, dass durch eine *sinI* Deletion das SinR Protein vorherrschend in der Zelle ist, wodurch die Expression von *slrR* und von *degU* gehemmt ist. Als Folge führt die verminderte DegU Menge zu der Kompetenzsteigerung. Wenn jedoch SlrR vorherrschend ist, bildet es üblicherweise ein Heterodimer mit SinR. Dieses Heterodimer ist in der Lage, Autolysin- und Motilitätsgene zu unterdrücken, wodurch die Differenzierung der Zellen zu Gunsten der Kompetenz verschoben wird (Ogura *et al.*, 2014). Wenn nun *slrR* deletiert ist, sollte der Zellzustand in Richtung der Autolysinbildung und Motilität verschoben sein. Dadurch müsste die Transformationsrate geringer sein.

Antwortregulator Aspartat Phosphatasen beeinflussen mit vielseitigen Wirkmechanismen über Quorum sensing Signale verschiedenste Differenzierungsvorgänge in der Zelle, unter anderem die Kompetenz. Um den Einfluss auf die Kompetenzentwicklung von REG19 zu charakterisieren, wurden die Gene *rapA*, *rapC*, *rapG* und *rapH* mit den ent-

sprechenden *phr* Genen deletiert. In keinem Fall ließ sich eine Steigerung der Transformationsrate beobachten (Abbildung 37). Im Falle von *rapA/phrA* war sogar eine deutliche Reduzierung der Transformationsrate zu beobachten. Dies war überraschend, da zumindest die Deletionen von *rapC*, *rapH* und *rapG* sich positiv auf die native Kompetenzbildung hätten auswirken müssen. Da die Rap Proteine sich in ihren Funktionen stark überlagern, ist es wahrscheinlich, dass die Deletionen von einzelnen *rap/phr* Genen durch die Anderen kompensiert werden. Der deutlichste Effekt zeigte sich nach der Deletion von dem Gen *rapA/phrA*. Hierbei war die Transformationsrate um den Faktor 10 reduziert. RapA dephosphoryliert Spo0F und sorgt so neben AbrB dafür, dass die Zellen während der vegetativen Wachstumsphase sich nicht differenzieren (Smits *et al.*, 2007a). Ein Ausfall dieses Genprodukts sollte die Menge an phosphoryliertem Spo0A deutlich erhöhen und damit die Differenzierung der Zellen weg von der Kompetenz und hin zur Sporulation verschieben. Tatsächlich zeigen *rapA* Mutanten einen Phänotyp der Hypersporulation. Einen wesentlich geringeren Einfluss, aber immerhin noch eine Halbierung der Transformationsrate, zeigte die Deletion von *rapG/phrG*. RapG beeinflusst die Aktivität von phosphoryliertem DegU, indem es die Expression einer Vielzahl von Genen wie extrazellulären Proteasen hemmt. Eine Überproduktion von RapG führt zum Verlust der *srfA* Expression und damit auch von *comS*, während bei der Deletion die *srfA* Expression etwa 2-fach gesteigert ist. Ogura *et al.* (2003) konnten auch zeigen, dass RapG ebenfalls die Bindung von DegU an den Promotor von *comK* hemmt. Somit müsste die Deletion zu einer gesteigerten Transformationsrate führen. Da DegU~P aber auch eine Vielzahl von Genen reguliert, insbesondere Proteasen wie AprE, aber auch die Motilität,  $\gamma$ -Polyglutamat und Biofilmbildung (Mäder *et al.*, 2002), könnte das Anschalten von all diesen Genen und der damit verbundene Energie- und Materialaufwand sich auch negativ auf die Kompetenz auswirken. Daher könnte es anstatt zur erwarteten Erhöhung zu einer Erniedrigung kommen.

Überraschenderweise zeigte sich, dass in REG19 das native *comK* Gen trotz der eingefügten Kompetenzkassette weiterhin notwendig für eine erfolgreiche Transformation ist. Die Transformationsrate des Stammes REG33 (*comK*) wies gerade einmal 730 Transformanten auf, wenn das Plasmid pWAL275 transformiert wurde (Abbildung 32). Dies ist eine Reduktion von 97 % im Vergleich zu REG19. Somit muss der Promoter  $P_{comK}$  stärker als der Promotor  $P_{mtlA}$  sein. Ein vergleichbares Ergebnis konnten bereits Hahn *et al.* (1996) zeigen, indem sie nachwiesen, dass  $P_{comK}$  stärker ist als der bereits starke Xylose induzierbare Promoter  $P_{xyl}$ . Die Bestimmung der Promotorstärke des  $P_{comK}$  im Ver-

gleich mit anderen Promotoren konnte in der Literatur allerdings nicht gefunden werden. Daher wurde dies in dieser Arbeit versucht. Leider konnten weder mittels der  $\beta$ -Galactosidase LacZ noch eGFP als Reporter die  $P_{comK}$  Aktivität nachgewiesen und dargestellt werden. Der Vergleich der Transformationsrate von REG19 mit REG33 lässt vermuten, dass die Kompetenz in REG19 über einen Zweistufenprozess aktiviert wird. Dabei ist das über den  $P_{mtlA}$  Promotor gebildete ComK notwendig, um die Expression von *comK* über die Bindung an  $P_{comK}$  zu aktivieren. Aufgrund der Wichtigkeit des natürlichen *comK* Genes wurde die Regulation des  $P_{comK}$  Promotors weiter untersucht. Dafür wurden zu den bereits diskutierten Proteinen, welche die Transkription von *comK* regulieren (Spo0A, AbrB und DegU) das Gen *rok* entfernt. Die Deletion führte zu einer deutlichen Abnahme der Transformationsrate. Dies lässt sich damit erklären, dass die Zellen eventuell aus der Kompetenzphase nicht mehr entkommen. Der Grund dafür ist, dass Rok, das üblicherweise erst gegen Ende der Kompetenz exprimiert wird, die *comK* Expression stoppt. Ohne diese Regulierung könnte es zu einer Situation kommen, die vergleichbar mit der Situation ist, bei der REG19 für mehr als 1,5 h mit Mannitol induziert wird. Diese führt ebenfalls zu einer Abnahme der transformierten koloniebildenden Zellen. Die Ergebnisse entsprechen auch der Arbeit von Schultz *et al.* (2009). Darin wurde bereits beschrieben, dass für eine optimale Transformationsrate eine kontinuierliche Zunahme der Spo0A Konzentration sowie eine exponentielle Steigerung der Rok Konzentration notwendig ist, um die ComK Konzentration in der Zelle abzusenken. Dieses Zusammenspiel ermöglicht der Zelle das Kompetenzfenster zu schließen und das Wachstum wieder aufzunehmen.

Bisher konnte gezeigt werden, dass das native *comK* Gen auch in REG19 essentiell für die Kompetenzentwicklung ist. Nun sollte geprüft werden, ob dies auch für die Faktoren gilt, die üblicherweise die Kompetenz aktivieren. Überraschenderweise zeigte sich nach der Deletion des *comQXPA* Operons, dass die Transformationsrate gesteigert werden konnte (Abbildung 32). Die Proteine des *comQXPA* Operons bilden ein Zwei-Komponentensystem, das über einen Quorum sensing Mechanismus in die Expression von *comS* mündet (Roggiani & Dubnau, 1993). ComS schützt ComK vor seinem Abbau (Turgay *et al.*, 1998; Prepiak & Dubnau, 2007). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Kompetenzexpressionskassette die natürliche Aktivierung ersetzt. Die Steigerung der Transformationsrate könnte möglicherweise damit begründet werden, dass der Antwortregulator ComA neben dem *srfA* Operon auch die Transkription der Gene *rapA*, *rapE* und *rapH* kontrolliert. Die Expression der *rap* Gene könnte sich daraufhin auf viele

weitere Signalwege in der Zelle auswirken. Zudem könnte die Deletion sich insofern positiv auf den Zellzustand auswirken, da eine Zelle im Allgemeinen für die Expression eines so großen Operons wie des *srfA*-Operons viel Energie benötigt und die Zelle somit in ihrem Stoffwechsel beeinflusst ist. Damit könnte ebenfalls erklärt werden, weshalb die Deletion des gesamten *srfA* Operons zu einer noch weiter gesteigerten Transformationseffizienz führte.

Wenn das *comS* Gen (ohne das *srfA* Operon) deletiert ist, zeigte sich dagegen eine deutliche Verminderung der Transformationsrate. Weshalb nun aber das natürliche ComS Protein in REG144, jedoch nicht in REG67 und REG32 notwendig war (Abbildung 32), ist nicht eindeutig erklärbar. Die negative Wirkung auf die Kompetenz könnte über eine nicht ausreichende Menge an ComK in REG144 ausgelöst werden. Diese führt dazu, dass die eigene positive Rückkopplung nicht aktiviert wird, da der Schwellenwert zur Kompetenzaktivierung nicht überschritten wird. Daher ist die Zelle möglicherweise auf eine höhere Menge an ComS angewiesen.

Die Proteinmenge innerhalb einer Zelle ist sowohl von ihrem Aufbau, als auch von ihrem Abbau abhängig. Daher gibt es einen weiteren Weg, um die Menge des ComK Proteins in der Zelle soweit zu erhöhen, dass es den Kompetenz initiiierenden Schwellenwert überschreiten kann. Dieser Weg besteht darin, das *mecA* Gen zu deletieren und somit den Abbau zu unterdrücken. Das Adaptorprotein MecA bildet üblicherweise zusammen mit den Proteinen ClpC und ClpP einen Komplex (Kong & Dubnau, 1994; Turgay *et al.*, 1997), der an ComK binden und damit ComK abbauen kann. Der Abbau kann einmal durch die Bindung von ComS (Turgay *et al.*, 1998; Prepiak *et al.*, 2011), aber ebenso durch eine Deletion des *mecA* Gens verhindert werden. Hahn *et al.* (1996) konnten bereits mit Hilfe eines Reportergens zeigen, dass in einem Stamm mit einer  $P_{xyIA}$  bedingten *comK* Überexpression die ComK abhängige Menge von ComG gesteigert war, wenn das *mecA* Gen deletiert war. Die Transformationsergebnisse in dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die Transformationsrate um 50% geringer ist, wenn eine *mecA* Deletion im Stamm REG19 vorlag (Abbildung 42). Gleichzeitig konnte bei der Anzucht zur Transformation ein zu REG19 verringertes Wachstum des Stammes beobachtet werden sowie das Auftreten kleinerer Kolonien. Da die Ergebnisse von Hahn *et al.* (1996) über das Reportergen *lacZ* nur auf die Bildung von mehr DNA-Aufnahmekomplexen in *mecA* Mutanten schließen lassen, könnte eine geringere Le-



bens- und Koloniebildungsfähigkeit zu der beobachteten Reduktion der Transformanten geführt haben.

Neben Faktoren, die einen direkten Einfluss auf die Kompetenzbildung haben, wurden in dieser Arbeit auch Faktoren untersucht, die auf Stress reagieren. Dies ist wichtig, da der Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase für die Zellen eine Stresssituation bedeutet. Für die allgemeine Stressantwort von *B. subtilis* ist vor allem der Sigma B Faktor zuständig. Daher wurde dieses Gen inaktiviert und die Reaktion der Zellen bezüglich der Transformation untersucht. Ein weiterer wichtiger Sigmafaktor ist Sigma D, der für die Motilität, Chemotaxis und Autolyse zuständig ist, dessen Gen ebenfalls in REG19 deletiert wurde. Es wurde erwartet, dass die Deletion der beiden Sigmafaktoren sich positiv auf die Transformationsrate auswirken sollte. Die Sigma B abhängige Protease ClpCP degradiert z.B. ComK, während Sigma D die Motilität und damit einen mit Kompetenz konkurrierenden Zellzustand aktiviert. Weiterhin zeigen *sigD* Mutanten eine erhöhte Fitness. Diese Erwartung der verbesserten Transformationsrate konnte im Experiment nicht bestätigt werden (Abbildung 40). Tatsächlich war diese in den Mutanten vermindert. Ähnliches wurde auch für den *B. subtilis* Wildtyp beobachtet. Es liegt wahrscheinlich daran, dass z.B. die Sigma D abhängige ClpCP Protease auch wichtige Funktionen im Zellzyklus einnimmt, dieser dann durch die Deletion ebenfalls beeinträchtigt ist. Offensichtlich sind die negativen Auswirkungen der Deletion auf das gesamte Zellverhalten stärker als die positive Wirkung auf die Kompetenz. Außerdem wurde für *clpC* beobachtet, dass dieses Gen in einem Operon von 6 Genen liegt und das letzte Gen dieses Operons für die Kompetenz wichtig ist. Dieses Gen wurde als *comY* bezeichnet (Krüger *et al.*, 1997). Möglicherweise ist die Transkription dieses Gens auch durch die Deletion beeinträchtigt. Unter dem Mikroskop war zu erkennen (Daten nicht gezeigt), dass die Deletion zu Zellen mit extrem langen Filamenten führt. Somit könnte die Transformationsrate, die durch Ausplattieren von Transformanten auf Agarplatten bestimmt wurde, daher vermindert sein. Möglicherweise sind in Filamenten angeordnete Zellen in der Bildung von Kolonien gehemmt.

Gamba *et al.* (2015) stellten fest, dass das Protein Kre (ComK Repressor) negativ auf die ComK Proteinmenge wirkt, indem es die Degradation der ComK mRNA reguliert. Wie erwartet, führte eine Deletion von *kre* in REG19 zu einer verbesserten Transformationseffizienz im Vergleich zu REG19, allerdings nur um 12 % (Abbildung 40). Auch Kre wirkt auf eine Vielzahl von anderen Genen, so dass auch hier vermutlich die

positive Wirkung auf die Kompetenz durch die negative Wirkung auf den Zellzyklus fast aufgehoben wurde.

Die Mannitol induzierte Expression von *comK* und *comS* in REG19 führte in den Transformationsversuchen zu einem veränderten Wachstum. Allgemein zeigte der REG19 Stamm bei Mannitolzugabe ein reduziertes Wachstum (Abbildung 23). Das Phänomen der Wachstumsreduktion könnte entweder auf die Mannitol Zugabe zu dem Medium zurückgeführt werden oder aber auf die zusätzliche Expression von *comK* und *comS*. Daher wurde in das Medium des Wildtyps ebenfalls Mannitol gegeben und das Wachstumsverhalten beobachtet. Da hierbei die Mannitol Zugabe das Wachstum sogar verbessert (Abbildung 23), hatte die zusätzliche Expression von *comK* und *comS* mit der Kompetenzaktivierung als Folge eine negative Auswirkung auf das Wachstum. Zudem war zu beobachten, dass die kompetenten Zellen nach der Überführung in ein frisches LB-Medium sich innerhalb einer Stunde nicht mehr teilten. Dieses Phänomen wurde auch bereits von anderen Arbeitsgruppen bei *B. subtilis* festgestellt (Cahn & Fox, 1968). Da ein solcher Wachstumsstopp aufgrund der Kompetenz nicht bei allen natürlich transformierbaren Organismen zu beobachten ist, muss dieser für die Kompetenz nicht notwendig sein. Hahn *et al.* (2015) vermuten viel eher, dass sich die Kopplung und die Regulierung des Wachstumsstopps bei der Kompetenz in *B. subtilis* aus ökonomischen Gründen in der Evolution gemeinsam entwickelt hat. Überraschenderweise war die Wachstumshemmung nicht mehr festzustellen, wenn das native *comK* Gen zusammen mit dem  $P_{comK}$  Promotor in dem Stamm REG19 deletiert war (Tabelle 24). Da dieser Stamm zudem nicht mehr transformierbar war, war gezeigt, dass die Wachstumshemmung mit der Kompetenzaktivierung gekoppelt ist. Weiter wurde ausgetestet, ob der Wachstumsstopp in REG19 verhindert werden kann, ohne die Transformationsrate zu beeinträchtigen. Dafür wurden verschiedene späte Kompetenz- und Zellteilungsgene wie *yne*, *maf* und *comZ* in REG19 deletiert. Die Deletionen zeigten jedoch keine Auswirkungen auf die Wachstumshemmung (Tabelle 27). Zudem führten die Deletionen von *yneA* sowie *comZ* zu einer geringeren Transformationsrate, während sie bei der Deletion des *maf* Gens unverändert blieb (Abbildung 39). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wachstumsblockade durch die Deletion der Zellteilungsgene *yne*, *maf* und *comZ* nicht unterbunden werden kann und offensichtlich andere Gene dafür verantwortlich sind. Bei längerer Inkubation von REG19 mit Mannitol nahm auch die Anzahl der Transformanten, die nach dem Ausplattieren Kolonien bilden können, ab (Abbildung 20). Somit sind für eine hohe Transformationsrate zwei Aspekte wichtig. Einerseits

müssen viele Zellen den ComK Schwellenwert überschreiten, der zur Ausbildung der Kompetenz führt. Andererseits muss nach der Aktivierung der Kompetenz die Menge an ComK schnell reduziert werden.

Eine erfolgreiche Transformation einer Zelle ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Zelle muss in der Lage sein, die freie DNA aufzunehmen. Danach muss sie ebenso wieder den Kompetenzstatus verlassen können, um eine Kolonie auszubilden. Vor allem muss die aufgenommene DNA, sich entweder als Plasmid etablieren oder in das Chromosom integrieren. Da die DNA als Einzelstrang in die Zelle aufgenommen wird, schützt sie sich mittels Einzelstrangbindeproteinen (DprA, SsbA, SsbB und RecN) vor dem intrazellulären Abbau (Inamine & Dubnau, 1995). Die Funktion von RecA bei der Transformation besteht hauptsächlich darin, die einzelsträngige DNA mit der chromosomalen DNA zu rekombinieren (Kidane *et al.*, 2012). Daher war der *recA* defiziente REG19 Stamm mit chromosomaler DNA nicht mehr transformierbar. Überraschenderweise und im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kidane *et al.* (2012), zeigte dieser Stamm ebenfalls bei der Transformation mit Plasmid DNA eine deutlich verminderte Transformationseffizienz (Abbildung 41). Dieses Ergebnis konnte durch die Transformation eines *recA* defizienten Stammes aus der BKE Sammlung in MG Medium ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 42). Die Ermittlung der Gesamtzellzahl an koloniebildenden Zellen nach der Transformation konnte diese Diskrepanz zu den Literaturdaten erklären. Es zeigte sich, dass die Zahl an lebenden Zellen in der REG117 Kultur während der Transformation, trotz gleicher optischer Dichte um den Faktor 4,6 geringer war im Vergleich zu REG19 (Abbildung 43). Die in der Literatur gefundenen Werte waren allesamt bereits korrigiert, einmal mit dem Korrekturfaktor der Lebendzellzahl, zum anderen auch durch die Anzahl an kompetenten Zellen, die durch die Aufnahme von radioaktiver DNA bestimmt wurde. Letzteres wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt, aber offensichtlich werden *recA* defiziente Zellen auch weniger kompetent. Multipliziert man die Anzahl der Transformanten von REG117 ( $\Delta recA$ ) mit dem Faktor, um den die Lebendzellzahl gegenüber REG19 verringert ist (4,6), so ist auch bei REG19 gezeigt, dass die Transformation von Plasmiden in *B. subtilis* RecA unabhängig ist.

Die Einzelstrang spezifische 5'-3' Exonuklease RecJ baut DNA ab, sofern sie nicht durch Einzelstrangbindeproteine geschützt ist (Sanchez *et al.*, 2005; Lenhart *et al.*, 2012). Da bei der DNA-Aufnahme nur Einzelstränge in die Zelle gelangen, sollte eine

Deletion von RecJ sich positiv auf die Transformationsrate auswirken. Tatsächlich wurde eine kleine Verminderung der Transformationsrate um 20 % im *recJ* defizienten REG19 Stamm beobachtet (Abbildung 41). Dies könnte auf Grund der Tatsache sein, dass dieser Stamm sehr sensitiv gegenüber DNA Brüchen ist (Sanchez *et al.*, 2005; Ohlsen *et al.*, 1994; Diaz *et al.*, 2012). Im Vergleich dazu nahm die Transformationsrate extrem ab, wenn *dprA* oder *addA* in REG19 deletiert waren. DprA, das als zusätzliches Einzelstrangbindeprotein zu SsbA und SsbB in *B. subtilis* 168 vorhanden ist, scheint essentiell für die Transformation zu sein und in seiner Funktion nicht durch SsbA oder SsbB ersetzt werden zu können. Bis jetzt ist die genaue Funktion von DprA noch nicht eindeutig definiert. Dies gilt ebenfalls für die ATP-abhängige Desoxyribonuklease AddA, die einen Teil des Helikase Nuklease Komplexes AddAB darstellt und wichtig bei der Transformation chromosomaler DNA ist. AddA entwindet den DNA-Doppelstrang und baut beide Stränge bis zu einer speziesspezifischen Chi-Sequenz ab. Die Deletion des Gens führte zu einer 91 % igen Abnahme der Transformationsrate und scheint damit ebenfalls wichtig für die Transformation mit Plasmid-DNA zu sein.

### 4.3 Auswirkung der DNA auf die Transformation

Wie schon erwähnt, ist die Transformation von Plasmid DNA RecA unabhängig (Zadrazil & Sponar, 1980). Doppelsträngige zirkuläre Plasmide werden zunächst linearisiert, dann als einzelsträngige DNA in die Zelle aufgenommen und daraus werden wieder doppelsträngige zirkuläre Moleküle generiert. Eine effiziente Transformation mit Plasmiden benötigt für den Zirkulationsprozess oligomere Plasmide. Eine um den Faktor 1000 verringerte Transformationsrate bei monomerer Plasmid-DNA gegenüber dimerer Plasmid-DNA (Canosi *et al.*, 1978) konnte in dieser Arbeit am Beispiel von REG19 nicht bestätigt werden, weder mit dem Plasmid pJOE4370 noch mit dem Plasmid pWAL275. In der Literatur wurden zwei Möglichkeiten beschrieben, wie ein zirkuläres Molekül in der Zelle etabliert werden kann. Im ersten Modell nutzt zunächst die DNA Polymerase das lineare einzelsträngige Molekül als Matrize und erzeugt darüber doppelsträngige lineare DNA mit einzelsträngigen Enden (Saunders & Guild, 1981; Kidane *et al.*, 2012). Dieses Molekül wird dann anschließend von RecO verwendet und durch Paarung der komplementären Enden in ein zirkuläres monomeres Plasmid umgewandelt. Eine solche Rekombination ist aber nur möglich, wenn Plasmidmultimere zur Transformation verwendet wurden. Die zweite Möglichkeit ist, dass zwei komplemen-

täre einzelsträngige Moleküle mit unterschiedlichen Enden aufgenommen werden, welche durch RecO oder eventuell auch DprA gepaart werden. Die Lücken werden anschließend mittels DNA Reparaturenzymen verschlossen, wodurch ein zirkuläres Plasmid entsteht.

Um die Plasmidtablierung genauer zu untersuchen wurde der REG19 Stamm mit zwei Plasmiden gleichzeitig transformiert. Diese beiden Plasmide (pREG51 und pREG52) unterscheiden sich zu ihrem Vorläuferplasmid pWAL275 darin, dass sie das Spectinomycinresistenzgen *aad9* enthalten, das jedoch in beiden Plasmiden aufgrund von Nonsense-Mutationen nicht komplett translatiert werden kann. Bei dem Plasmid pREG51 kann nur ein Drittel und bei pREG52 zwei Drittel des Resistenzgens translatiert werden. Die Überlegung war, dass wenn REG19 mit beiden Plasmiden gleichzeitig transformiert wird, eine Zelle möglicherweise auch beide Plasmide aufnehmen und die komplementären Einzelstränge paaren. In diesem Fall würde es zu zwei Fehlpaarungen kommen, die anschließend von einem DNA-Reparatursystem erkannt und repariert werden können. Dies kann die Zelle mit einer geringen Wahrscheinlichkeit spectinomycinresistent machen. Nach dieser Hypothese würden in 50 % der Fälle die beiden aufgenommenen Stränge von einem Plasmid kommen und in den anderen 50 % der Fälle von zwei unterschiedlichen Plasmiden. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei den beiden Fehlpaarungen jeweils die Wildtypsequenz entsteht und damit die Kolonien spectinomycinresistent werden, liegt bei 25 %. Entsprechend dieser Annahme würden im optimalen Fall 12,5 % der kanamycinresistenten Kolonien auch spectinomycinresistent werden. Im Experiment zeigte sich, dass jedoch 30 % der kanamycinresistenten Zellen ebenfalls spectinomycinresistent waren (Abbildung 45). Also weit mehr als nach dieser Hypothese zu erwarten waren. Wenn für dieses Experiment Plasmide statt in einer multimeren- in einer monomeren Konformation eingesetzt wurden, wurden wie üblich deutlich weniger Transformanten erhalten. Dennoch war die Anzahl an spectinomycinresistenten Zellen fast identisch. Somit muss die Ausgangssituation der Plasmide für die Rekombination gleich sein, ganz egal in welcher Konformation das aufgenommene Plasmid vorliegt. Alternativ könnten die beiden Einzelstränge aufgenommen, über Replikation zu Doppelsträngen ergänzt werden und unabhängig voneinander zu zirkulären Plasmiden etablieren. Diese könnten sich anschließend miteinander rekombinieren und damit ebenfalls, aber vermutlich mit einer anderen Wahrscheinlichkeit, zu spectinomycinresistenten Zellen führen. Wie hoch diese Wahrscheinlichkeit ist, lässt sich jedoch nicht vorhersagen. Nach diesem Modell sollten keine spectinomycinresistenten Zellen

entstehen, wenn die Transformation in einem *recA* defizienten Stamm durchgeführt wird. Dies war tatsächlich der Fall. Bei der Wiederholung dieses Versuchs mit dem Stamm REG117 (REG19 *recA::cm*) konnten keine spectinomycinresistenten Kolonien festgestellt werden (Abbildung 46). Dies spricht dafür, dass der aufgenommene Plasmid Einzelstrang zu einem doppelsträngigen Plasmid etabliert wird, bei dem RecA nicht involviert ist. Es ist auch unabhängig davon, ob noch ein weiterer Einzelstrang eines Plasmides aufgenommen wurde. Bei diesem Modell bleibt jedoch offen, wie sich aus einem monomeren Einzelstrang ein zirkuläres Plasmid formen kann, ohne dass Deletionen entstehen.

Aufgrund der hohen Transformationsrate von REG19 war es möglich, dessen Genom über eine vereinfachte Weise zu verändern. Bei diesem Verfahren konnte zudem auf die Verwendung eines Plasmides verzichtet werden (Abbildung 51). Mit Hilfe der Gibson Assembly Methode wurden zwei Konstrukte aus drei DNA Fragmenten (*amyE'*-*aad9'*-*amyE*) gebildet. Das zweite Konstrukt unterschied sich darin, dass ebenfalls überlappende Sequenzen an den äußeren Oligomeren der *amyE* flankierenden Sequenzen angehängt wurden. Darüber konnten sich konkatemere bzw. zirkuläre Fragmente bilden. Beide Konstrukte führten zu spectinomycinresistenten Kolonien. Das konkatemere Konstrukt wies jedoch eine höhere Transformationsrate auf. Dies lässt sich einmal durch den Transformationsmechanismus und zum anderen durch die Gibson Assembly Methode erklären. Der erste Schritt zur Transformation ist ein Doppelstrangbruch in der aufzunehmenden DNA. Bei monomeren Molekülen bedeutet dies eine Verkürzung von einer der flankierenden Regionen, die für die spätere homologe Rekombination gebraucht wird. Weiterhin ist für das Gibson Assembly eine Exonuklease nötig, die komplementäre Einzelstrangenden schafft. Nach der Ligation der überlappenden Enden sind diese vor einem weiteren Abbau geschützt, während die äußeren Enden weiterhin einem Abbau unterliegen. In konkatemerer DNA spielen diese Vorgänge keine bzw. eine untergeordnete Rolle. Andererseits wurde mit dem monomeren Konstrukt eine 100 % ige Inaktivierung der Amylasefunktion erreicht, während mit dem konkatemeren Molekül nur 80 % der Zellen auch das *amyE* Gen verloren hatten. Dies erklärt sich hiermit, dass neben konkatemeren- auch zirkuläre Moleküle entstehen können. Diese können durch ein Einzelcrossover integrieren und damit zu antibiotikaresistenten Zellen führen, die aber keine gleichzeitige Deletion aufweisen. Einen wichtigen Faktor für eine erfolgreiche Transformation mit chromosomaler DNA stellt die Art und Länge der homologen Bereiche dar. Die Transformationsrate war 100-fach gesteigert im Ver-

gleich zu Plasmid-DNA, wenn die, für die Transformation, verwendete DNA sich nur in einer Punktmutation von der chromosomalen DNA unterschied (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 19). Als Vergleich wurden Fragmente für Deletionen und DNA Insertionen verwendet, bei denen die homologe Region unterbrochen ist. Die Transformationsrate konnte nochmals um das 2,3-fache gesteigert werden, wenn anstelle der gesamten chromosomalen DNA nur ein PCR Fragment verwendet wurde. Dabei wurde immer so viel DNA eingesetzt, dass die DNA in der Sättigung vorlag. Dies liegt daran, dass anstatt dem gesamten Chromosom (4214 kb) nur 3 kb der entsprechenden Region und damit eine viel höhere Kopienzahl für die nachfolgende Rekombination erreicht wird. Unter der Berücksichtigung, dass bei der Transformation mit den PCR-Fragmenten (600 ng) nur ein Fünftel der chromosomalen DNA (3 µg) eingesetzt wurde, wäre eine 28-fache Steigerung anstatt einer 2,3-fachen Steigerung erwartet worden. Dieses Missverhältnis kann mit der unterschiedlichen Länge der Moleküle erklärt werden. Mit dem wesentlich längeren Molekül der chromosomalen DNA ist bei 3 µg verwendeter DNA der Sättigungsbereich der DNA-Aufnahme gerade erreicht. Dagegen ist im Falle des PCR-Fragments mit 600 ng der Sättigungsbereich weit überschritten. Des Weiteren ist das PCR-Fragment wesentlich kürzer und da der erste Schritt der Transformation aus einem Doppelstrangbruch besteht, sind diese zufällig verkürzten Fragmente weniger effektiv in der homologen Rekombination.

Zusätzlich wurde der Einfluss der PCR Fragmentlänge und die Position der Punktmutation untersucht. Wenig überraschend zeigte sich, dass ein 3 kb langes Fragment mit drei weiteren Basen in der Mitte der Sequenz das beste Ergebnis erzielte, während kürzere Fragmente, bei denen die Baseninsertion näher an einem Ende lagen, deutlich weniger Transformanten ergaben (Abbildung 53). Trotz einer hohen Transformationsrate bei *B. subtilis* REG19 ist jeweils ein Selektionsmarker notwendig, um die Transformanten aus den nichttransformierten Zellen herauszufinden. Dies bedeutet eine starke Einschränkung in der Stammoptimierung, da nicht selektionierbare Eigenschaften nur mit einem großen Aufwand in einer Zelle etabliert werden können. Daher wurde REG19 darauf getestet, ob die gesteigerte DNA-Aufnahmerate eine genomische Veränderung, ohne Selektionsdruck mittels einer Kotransformation ermöglicht. Da die Transformationsrate mit der Plasmid DNA im Vergleich zur chromosomalen DNA ca. 1000-fach niedriger ist, wurde REG19 mit einem Plasmid zusammen mit einem chromosomalen Fragment transformiert. Die Erwartung war, dass wenn eine Zelle Plasmid-DNA aufnimmt und etabliert, diese gleichzeitig mit einer großen Wahrscheinlichkeit das PCR-

Fragment im Chromosom etabliert, da dies ein viel häufigeres Ereignis darstellt. Tatsächlich war in 9 % der Zellen, die das Plasmid etabliert hatten, auch eine erfolgreiche Rekombination im Chromosom aufgetreten (Abbildung 55). Dieser Prozentsatz ist nicht optimal. Er liegt jedoch in einer Größenordnung, um nicht selektionierbare Eigenschaften ohne großen Arbeitsaufwand in das Chromosom von *B. subtilis* einzufügen. Eine weitere Steigerung der Transformationsrate wurde erzielt, indem der vor *comK* und *comS* liegende, mit Mannitol induzierbare Promotor  $P_{m1A}$  durch einen durch Cellibiose induzierbaren Promotor  $P_{licB}$  (REG89) ersetzt wurde. Durch diesen Promotor ließ sich die Transformationsrate im Vergleich zu REG19 um das 2,5 fache steigern (Abbildung 47). Gleichzeitig erhöhte sich auch die Transformationsrate, wenn keine Cellibiose zur Induktion verwendet wurde. Dies weist auf eine hohe basale Expression des Promotors hin. Ein Nebeneffekt war, dass nun auch das native *comK* Gen mit seinem Promotor nicht mehr nötig war. Dadurch konnte ein Stamm generiert werden, in dem das native *comK* Gen zusammen mit  $P_{comK}$  durch die Kompetenzexpressionskassette  $P_{licB-comK-comS}$  ersetzt war (REG154). Dieser Stamm zeigte nicht nur eine hohe Transformations- und normale Wachstumsrate während der dreistündigen Tagkultur, sondern auch eine geringere Wachstumshemmung in frischem Medium. Unter dem Mikroskop zeigte sich, dass die Zahl an kompetenten Zellen etwa gleich hoch war wie bei REG19 (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass dieser Stamm eine optimale *comK* Expression aufzeigt. Dieser Stamm sollte sich sehr gut eignen, um Signalwege zu untersuchen, bei denen Mutationen die Differenzierung beeinflussen und in Wildtypzellen zum Verlust der Kompetenz führen. Da dieser Stamm, auch nach den Mutationen, durch seine Kompetenz weiter genetisch zugänglich ist und darüber hinaus eine hohe Transformationsrate aufweist, bietet er sich für eine effiziente und schnelle Stammoptimierung in der industriellen Nutzung an.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in dem Stamm *B. subtilis* 168 eine zusätzliche Mannitol induzierte Expression von *comK* und *comS* zu einer gesteigerten Anzahl von kompetenten Zellen und einer erhöhten Transformationsrate führt. Darüber war es möglich, die Zellen in LB-Medium anstatt in Minimalmedium mit Glucose zu kultivieren und transformieren. Die LB-Methode ist zudem zeitlich kürzer. Anschließend erfolgte eine Analyse einer Vielzahl von Faktoren, die die Transkription von *comK* und



posttranskriptionale Modifikationen des Transkriptionsfaktors beeinflussen. Es zeigte sich, dass sowohl die natürliche Aktivierung der Kompetenz über den Quorum sensing Mechanismus (ComQXPA) als auch die erleichterte Anlagerung von ComK an den eigenen Promotor durch DegU in REG19 nicht mehr für die Kompetenz wichtig sind. Tatsächlich steigerte die Deletion des *degU* Gens sogar die Transformation, während in einem Wildtyp-Stamm dies den Verlust der Kompetenz zur Folge hatte. Im Kompetenzzustand sind die Zellen in der Zellteilung gehemmt. Dies limitiert eine weitere Steigerung der ComK Menge und der Transformationsrate, indem die Zellen das Kompetenzstadium nicht mehr verlassen können und sogar das Wachstum völlig einstellen. Eine weiterhin hohe Transformationsrate ergab sich, wenn der  $P_{mliA}$  Promotor durch den  $P_{licB}$  Promotor in der Kompetenzkassette ersetzt wurde und mit dieser Konstruktion das natürliche *comK* Gen ersetzt wurde. In diesem Fall war während der Inkubation zur DNA-Aufnahme keine Wachstumshemmung zu beobachten. Darauf aufbauend könnten in diesem Stamm alle Faktoren entfernt werden, die die Differenzierung der Zellen von der Kompetenz weg lenken. Damit könnte ein superkompetenter Stamm konstruiert werden, mit dem sich einfach und effizient Hochleistungsproduktionsstämme entwickeln lassen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Albano, M., Hahn, J. und Dubnau, D.** (1987). Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169** (7): 3110–3117.
- Anagnostopoulos, C. und Spizizen, J.** (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81** (5): 741–746.
- Ansaldi, M., Marolt, D., Stebe, T., Mandic-Mulec, I. und Dubnau, D.** (2002). Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Mol Microbiol* **44** (6): 1561–1573.
- Avery, O. T., Macleod, C. M. und McCarty, M.** (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* **79** (2): 137–158.
- Bacon Schneider, K., Palmer, T. M. und Grossman, A. D.** (2002). Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184** (2): 410–419.
- Bai, U., Mandic-Mulec, I. und Smith, I.** (1993). SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes Dev* **7** (1): 139–148.
- Banse, A. V., Chastanet, A., Rahn-Lee, L., Hobbs, E. C. und Losick, R.** (2008). Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **105** (40): 15547–15552.
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallet, D., Wang, T., Moszer, I. et al.** (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155** (Pt 6): 1758–1775.
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62** (3): 293–300.
- Bettinger, G. E. und Young, F. E.** (1975). Transformation of *Bacillus subtilis*: Transforming ability of deoxyribonucleic acid in lysates of L-forms or protoplasts. *J Bacteriol* **122** (3): 987.
- Biswas, G. D., Sox, T., Blackman, E. und Sparling, P. F.** (1977). Factors affecting genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **129** (2): 983–992.
- Bongiorni, C., Ishikawa, S., Stephenson, S., Ogasawara, N. und Perego, M.** (2005). Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems. *J Bacteriol* **187** (13): 4353–4361.
- Briley, K., Jr., Dias, M. J., Dubnau, D., Hahn, J. und Prepiak, P.** (2011). Maf acts downstream of ComGA to arrest cell division in competent cells of *B. subtilis*. *Mol Microbiol* **81** (1): 23–39.
- Burbulys, D., Trach, K. A. und Hoch, J. A.** (1991). Initiation of Sporulation in *B. subtilis* is Controlled by a Multicomponent Phosphorelay. *Cell (Cambridge, MA, U S.)* **64** (3): 545–552.

- Burkholder, P. R. und Giles, N. H., Jr.** (1947). Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot* **34** (6): 345–348.
- Butler, Y. X., Abhayawardhane, Y. und Stewart, G. C.** (1993). Amplification of the *Bacillus subtilis maf* gene results in arrested septum formation. *J Bacteriol* **175** (10): 3139–3145.
- Cahn, F. H. und Fox, M. S.** (1968). Fractionation of transformable bacteria from competent cultures of *Bacillus subtilis* on renografin gradients. *J Bacteriol* **95** (3): 867–875.
- Cano, R. und Borucki, M.** (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* **268** (5213): 1060–1064.
- Canosi, U., Morelli, G. und Trautner, T. A.** (1978). The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol Gen Genet* **166** (3): 259–267.
- Carter, H. L., III und Moran, C. P., Jr.** (1986). New RNA polymerase sigma factor under *spo0* control in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **83** : 9438–9442.
- Chai, Y., Norman, T., Kolter, R. und Losick, R.** (2010). An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **24** (8): 754–765.
- 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. *PNAS* **86** (7): 2172–2175.
- Claverys, J. P. und Lacks, S. A.** (1986). Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiological reviews* **50** (2): 133–165.
- Claverys, J.-P., Martin, B. und Polard, P.** (2009). The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **33** (3): 643–656.
- Cohn, F. J.** (1872). Untersuchungen über Bakterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. **1** (2): 127–224.
- Comella, N. und Grossman, A. D.** (2005). Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **57** (4): 1159–1174.
- Commichau, F. M., Pietack, N. und Stülke, J.** (2013). Essential genes in *Bacillus subtilis*: a re-evaluation after ten years. *Mol Biosyst* **9** (6): 1068–1075.
- Core, L. und Perego, M.** (2003). TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49** (6): 1509–1522.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J. und Claverys, J.-P.** (2004). Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Mol Microbiol* **51** (4): 1071–1086.
- de Vos, W., Venema, G., Canosi, U. und Trautner, T. A.** (1981). Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: fate of plasmid DNA. *Mol Gen Genet* **181** (4): 424–433.

- Diaz, A. R., Core, L. J., Jiang, M., Morelli, M., Chiang, C. H., Szurmant, H. und Perego, M.** (2012). *Bacillus subtilis* RapA phosphatase domain interaction with its substrate, phosphorylated Spo0F, and its inhibitor, the PhrA peptide. *J Bacteriol* **194** (6): 1378–1388.
- Draskovic, I. und Dubnau, D.** (2005). Competence for genetic transformation. In: Peter Mullany (Hg.): *The Dynamic Bacterial Genome*. Cambridge: Cambridge University Press: 235–274.
- D'Souza, C., Nakano, M. M. und Zuber, P.** (1994). Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **91** : 9397–9401.
- Dubnau, D.** (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **55** (3): 395–424.
- Dubnau, D.** (1999). DNA UPTAKE IN BACTERIA. *Annu Rev Microbiol* **53** : 217–244.
- Dubnau, D., Davidoff-Abelson, R., Scher, B. und Cirigliano, C.** (1973). Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants. *J Bacteriol* **114** (1): 272–286.
- Dubnau, D., Hahn, J., Roggiani, M., Piazza, F. und Weinrauch, Y.** (1994). Two-component regulators and genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **145** (5-6): 403–411.
- Duitman, E. H., Wyczawski, D., Boven, L. G., Venema, G., Kuipers, O. P. und Hamoen, L. W.** (2007). Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Appl Environ Microbiol* **73** (11): 3490–3496.
- Ehrenberg, C. G.** (1835). Dritter Beitrag zur Erkenntnis großer Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Physikalische Abhandlung der Königlich Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833-1835* : 143–336.
- Eisenstein, B. I., Sox, T., Biswas, G., Blackman, E. und Sparling, P. F.** (1977). Conjugal transfer of the gonococcal penicillinase plasmid. *Science* **195** (4282): 998–1000.
- Fehér, T., Papp, B., Pal, C. und Pósfai, G.** (2007). Systematic genome reductions: theoretical and experimental approaches. *Chemical reviews* **107** (8): 3498–3513.
- Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A. und Murray, N.** (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol* **170** (4): 827–842.
- Fuchs, G., Schlegel, H. G. und Eitinger, T.** (2007). Allgemeine Mikrobiologie. *Thieme*.
- Gamba, P., Jonker, M. J. und Hamoen, L. W.** (2015). A Novel Feedback Loop That Controls Bimodal Expression of Genetic Competence. *PLoS Genet* **11** (6): e1005047.
- Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R.-Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L. et al.** (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329** (5987): 52–56.
- Gilman, M. Z. und Chamberlin, M. J.** (1983). Developmental and genetic regulation of *Bacillus subtilis* genes transcribed by  $\sigma$ 28-RNA polymerase. *Cell (Cambridge, MA, U S.)* **35** (1): 285–293.

- González-Pastor, J. E.** (2011). Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **35** (3): 415–424.
- Griffith, F.** (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27** (2): 113–159.
- Hahn, J., Bylund, J., Haines, M., Higgins, M. und Dubnau, D.** (1995). Inactivation of *mecA* prevents recovery from the competent state and interferes with cell division and the partitioning of nucleoids in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **18** (4): 755–767.
- Hahn, J. und Dubnau, D.** (1991). Growth stage signal transduction and the requirements for *srfA* induction in development of competence. *J Bacteriol* **173** (22): 7275–7282.
- Hahn, J., Luttinger, A. und Dubnau, D.** (1996). Regulatory inputs for the synthesis of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **21** (4): 763–775.
- Hahn, J., Tanner, A. W., Carabetta, V. J., Cristea, I. M. und Dubnau, D.** (2015). ComGA-RelA interaction and persistence in the *Bacillus subtilis* K-State. *Mol Microbiol* **97** (3): 454–471.
- Hajjema, B.-J., Hahn, J., Haynes, J. und Dubnau, D.** (2001). A ComGA dependent checkpoint limits growth during the escape from competence. *Mol Microbiol* **40** (1): 52–64.
- Haldenwang, W. G.** (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **59** (1): 1–30.
- Hamoen, L. W.** (2011). Cell division blockage: but this time by a surprisingly conserved protein. *Mol Microbiol* **81** (1): 1–3.
- Hamoen, L. W., Kausche, D., Marahiel, M. A., van Sinderen, D., Venema, G. und Serror, P.** (2003a). The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the -35 promoter region of *comK*. *FEMS Microbiol Lett* **218** (2): 299–304.
- Hamoen, L. W., van Werkhoven, A. F., Bijlsma, J. J., Dubnau, D. und Venema, G.** (1998). The competence transcription factor of *Bacillus subtilis* recognizes short A/T-rich sequences arranged in a unique, flexible pattern along the DNA helix. *Genes Dev* **12** (10): 1539–1550.
- Hamoen, L. W., van Werkhoven, A. F., Venema, G. und Dubnau, D.** (2000). The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **97** (16): 9246–9251.
- Hamoen, L. W., Venema, G. und Kuipers, O. P.** (2003b). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* **149** (1): 9–17.
- Hartwell, L.** (2004). Genetics - From genes to genomes. *McGraw-Hill Higher Education Boston, Mass.*
- Harwood, C. R. und Wipat, A.** (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters* **389** (1): 84–87.
- Hayashi, K., Kensuke, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N. und Ogura, M.** (2006). *Bacillus subtilis* RghR (YvaN) represses *rapG* and *rapH*, which encode inhibitors of expression of the *srfA* operon. *Mol Microbiol* **59** (6): 1714–1729.
- Helmann, J. D.** (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in microbial physiology* **46** : 47–110.

- Helmann, J. D., Márquez, L. M. und Chamberlin, M. J.** (1988). Cloning, sequencing, and disruption of the *Bacillus subtilis* sigma 28 gene. *J Bacteriol* **170** (4): 1568–1574.
- Heravi, K. M.** (2013). Regulation of the mannitol utilization genes in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Universität Stuttgart, Stuttgart. Institut für Industrielle Genetik.
- Heravi, K. M. und Altenbuchner, J.** (2014). Regulation of the *Bacillus subtilis* mannitol utilization genes: promoter structure and transcriptional activation by the wild-type regulator (MtlR) and its mutants. *Microbiology* **160** (Pt 1): 91–101.
- 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.
- Hoch, J. A.** (1993). Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Microbiol* **47** : 447–465.
- Inamine, G. S. und Dubnau, D.** (1995). ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J Bacteriol* **177** (11): 3045–3051.
- Jaacks, K. J., Healy, J., Losick, R. und Grossman, A. D.** (1989). Identification and characterization of genes controlled by the sporulation-regulatory gene *spo0H* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **171** (8): 4121–4129.
- Jeske, M. und Altenbuchner, J.** (2010). The *Escherichia coli* rhamnose promoter *rhaP<sub>BAD</sub>* is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp-cAMP activation. *Appl Microbiol Biotechnol* **85** (6): 1923–1933.
- Jian, M., Grau, R. und Perego, M.** (2000). Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182** (2): 303–310.
- 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.
- Kampf, J. und Stülke, J.** (2015). Minor Cause-Major Effect: A Novel Mode of Control of Bistable Gene Expression. *PLoS Genet* **11** (6): e1005229.
- Kawai, Y., Moriya, S. und Ogasawara, N.** (2003). Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **47** (4): 1113–1122.
- Kidane, D., Ayora, S., Sweasy, J. B., Graumann, P. L. und Alonso, J. C.** (2012). The cell pole: the site of cross talk between the DNA uptake and genetic recombination machinery. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47** (6): 531–555.
- Kidane, D., Carrasco, B., Manfredi, C., Rothmaier, K., Ayora, S., Tadesse, S., Alonso, J. C. und Graumann, P. L.** (2009). Evidence for different pathways during horizontal gene transfer in competent *Bacillus subtilis* cells. *PLoS Genet* **5** (9): e1000630.
- Kirkpatrick, D. P., Rao, B. J. und Radding, C. M.** (1992). RNA-DNA hybridization promoted by *E. coli* RecA protein. *Nucleic Acids Res* **20** (16): 4339–4346.
- Kobayashi, K.** (2007). Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **66** (2): 395–409.

- Kobayashi, K.** (2008). SlrR/SlrA controls the initiation of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **69** (6): 1399–1410.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S. et al.** (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *PNAS* **100** (8): 4678–4683.
- Koetje, E. J., Hajdo-Milasinovic, A., Kiewiet, R., Bron, S. und Tjalsma, H.** (2003). A plasmid-borne Rap-Phr system of *Bacillus subtilis* can mediate cell-density controlled production of extracellular proteases. *Microbiology* **149** (Pt 1): 19–28.
- Kong, L. und Dubnau, D.** (1994). Regulation of competence-specific gene expression by Mec-mediated protein-protein interaction in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **91** (13): 5793–5797.
- Krüger, E., Msadek, T., Ohlmeier, S. und Hecker, M.** (1997). The *Bacillus subtilis* *clpC* operon encodes DNA repair and competence proteins. *Microbiology (Reading, England)* **143** (Pt 4) : 1309–1316.
- Kunst, F., Msadek, T., Bignon, J. und Rapoport, G.** (1994). The DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **145** (5-6): 393–402.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A. et al.** (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390** (6657): 249–256.
- Lazazzera, B. A., Kurtser, I. G., McQuade, R. S. und Grossman, A. D.** (1999). An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **181** (17): 5193–5200.
- LeDeaux, J. R., Yu, N. und Grossman, A. D.** (1995). Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **177** (3): 861–863.
- Leisner, M., Stingl, K., Frey, E. und Maier, B.** (2008). Stochastic switching to competence. *Curr Opin Microbiol* **11** (6): 553–559.
- Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., Walsh, B. W. und Simmons, L. A.** (2012). DNA Repair and Genome Maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev* **76** (3): 530–564.
- Liu, J.** (2003). Computational identification of the Spo0A-phosphate regulon that is essential for the cellular differentiation and development in Gram-positive spore-forming bacteria. *Nucleic acids research* **31** (23): 6891–6903.
- Liu, L., Nakano, M. M., Lee, O. H. und Zuber, P.** (1996). Plasmid-amplified *comS* enhances genetic competence and suppresses *sinR* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178** (17): 5144–5152.
- Lo Scrudato, M. und Blokesch, M.** (2012). The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* **8** (6): e1002778.
- Lopez, D., Vlamakis, H. und Kolter, R.** (2009). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **33** (1): 152–163.
- Love, P. E., Lyle, M. J. und Yashin, R. E.** (1985). DNA-damage-inducible (*din*) loci are transcriptionally activated in competent *Bacillus subtilis*. *PNAS* **82** (18): 6201–6205.

- MacFadyen, L. P., Chen, D., Vo, H. C., Liao, D., Sinotte, R. und Redfield, R. J.** (2001). Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. *Mol Microbiol* **40** (3): 700–707.
- MacFadyen, L. P., Dorocicz, I. R., Reizer, J., Saier, M. H. und Redfield, R. J.** (1996). Regulation of competence development and sugar utilization in *Haemophilus influenzae* Rd by a phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase system. *Mol Microbiol* **21** (5): 941–952.
- Mäder, U., Antelmann, H., Buder, T., Dahl, M., Hecker, M. und Homuth, G.** (2002). *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol Gen Genet* **268** (4): 455–467.
- Magnuson, R., Solomon, J. und Grossman, A. D.** (1994). Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell (Cambridge, MA, U S.)* **77** (2): 207–216.
- Maier, B., Chen, I., Dubnau, D. und Sheetz, M. P.** (2004). DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nat Struct Mol Biol* **11** (7): 643–649.
- Márquez, L. M., Helmann, J. D., Ferrari, E., Parker, H. M., Ordal, G. W. und Chamberlin, M. J.** (1990). Studies of sigma D-dependent functions in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **172** (6): 3435–3443.
- Martin, B., Granadel, C., Campo, N., Hénard, V., Prudhomme, M. und Claverys, J.-P.** (2010). Expression and maintenance of ComD-ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **75** (6): 1513–1528.
- Mascher, T.** (2013). Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factors. *Current opinion in microbiology* **16** (2): 148–155.
- Mascher, T., Helmann, J. D. und Udden, G.** (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **70** (4): 910–938.
- McQuade, R. S., Comella, N. und Grossman, A. D.** (2001). Control of a family of phosphatase regulatory genes (*phr*) by the alternate sigma factor sigma-H of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **183** (16): 4905–4909.
- Meijer, W. J., Wisman, G. B., Terpstra, P., Thorsted, P. B., Thomas, C. M., Holsappel, S., Venema, G. und Bron, S.** (1998). Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **21** (4): 337–368.
- Michel, J. F. und Millet, J.** (1970). Physiological Studies on Early-blocked Sporulation Mutants of *Bacillus subtilis*. *J Appl Bacteriol* **33** (1): 220–227.
- Mirouze, N., Desai, Y., Raj, A., Dubnau, D. und Hughes, D.** (2012). Spo0A~P Imposes a Temporal Gate for the Bimodal Expression of Competence in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **8** (3): 1-15 e1002586.
- Mo, A. H. und Burkholder, W. F.** (2010). YneA, an SOS-Induced Inhibitor of Cell Division in *Bacillus subtilis*, Is Regulated Posttranslationally and Requires the Transmembrane Region for Activity. *J Bacteriol* **192** (12): 3159–3173.



- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S. T., Eichenberger, P., González-Pastor, J. E., Liu, J. S. und Losick, R.** (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **50** (5): 1683–1701.
- Mordini, S., Osera, C., Marini, S., Scavone, F., Bellazzi, R., Galizzi, A. und Calvio, C.** (2013). The role of SwrA, DegU and P(D3) in *fla/che* expression in *B. subtilis*. *PLoS ONE* **8** (12): e85065.
- Moszer, I., Jones, L. M., Moreira, S., Fabry, C. und Danchin, A.** (2002). SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic acids research* **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. *Iranian J Biotech* **5** (2): 105–109.
- Murray, E. J., Kiley, T. B. und Stanley-Wall, N. R.** (2009). A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour. *Microbiology* **155** (1): 1–8.
- 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.
- Narra, H. P. und Ochman, H.** (2006). Of what use is sex to bacteria? *Curr Biol* **16** (17): R705-10.
- Nijland, R., Burgess, J. G., Errington, J., Veening, J.-W. und Redfield, R. J.** (2010). Transformation of Environmental *Bacillus subtilis* Isolates by Transiently Inducing Genetic Competence. *PLoS ONE* **5** (3): e9724.
- Notani, N. K., Setlow, J. K., McCarthy, D. und Clayton, N. L.** (1981). Transformation of *Haemophilus influenzae* by plasmid RSF0885. *J Bacteriol* **148** (3): 812–816.
- Ogura, M., Liu, L., Lacelle, M., Nakano, M. M. und Zuber, P.** (1999). Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32** (4): 799–812.
- Ogura, M., Ohshiro, Y., Hirao, S. und Tanaka, T.** (1997). A new *Bacillus subtilis* gene, *med*, encodes a positive regulator of *comK*. *J Bacteriol* **179** (20): 6244–6253.
- Ogura, M., Shimane, K., Asai, K., Ogasawara, N. und Tanaka, T.** (2003). Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49** (6): 1685–1697.
- Ogura, M., Yoshikawa, H. und Chibazakura, T.** (2014). Regulation of the response regulator gene *degU* through the binding of SinR/SlrR and exclusion of SinR/SlrR by DegU in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **196** (4): 873–881.
- Ohlsen, K. L., Grimsley, J. K. und Hoch, J. A.** (1994). Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *PNAS* **91** (5): 1756–1760.
- Palchevskiy, V. und Finkel, S. E.** (2006). *Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient. *J Bacteriol* **188** (11): 3902–3910.
- Parashar, V., Jeffrey, P. D., Neiditch, M. B. und Laub, M. T.** (2013). Conformational Change-Induced Repeat Domain Expansion Regulates Rap Phosphatase Quorum-Sensing Signal Receptors. *PLoS Biol* **11** (3): e1001512.

- Paredes-Sabja, D., Setlow, P. und Sarker, M. R.** (2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol* **19** (2): 85–94.
- Perego, M.** (1997). A peptide export–import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *PNAS* **94** : 8612–8617.
- Perego, M. und Brannigan, J. A.** (2001). Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* **22** (10): 1541–1547.
- Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P. und Hoch, J. A.** (1994). Multiple protein aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell (Cambridge, MA, U S.)* **79** (6): 1047–1055.
- Perego, M., Spiegelman, G. B. und Hoch, J. A.** (1988). Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **2** (6): 689–69.
- Persuh, M., Turgay, K., Mandic-Mulec, I. und Dubnau, D.** (1999). The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. *Mol Microbiol* **33** (4): 886–894.
- Pottathil, M. und Lazazzera, B. A.** (2003). The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **8** : d32-45.
- Prepiak, P., Defrancesco, M., Spadavecchia, S., Mirouze, N., Albano, M., Persuh, M., Fujita, M. und Dubnau, D.** (2011). MecA dampens transitions to spore, biofilm exopolysaccharide and competence expression by two different mechanisms. *Mol Microbiol* **80** (4): 1014–1030.
- Prepiak, P. und Dubnau, D.** (2007). A peptide signal for adapter protein-mediated degradation by the AAA+ protease ClpCP. *Molecular cell* **26** (5): 639–647.
- Quisel, J. D., Burkholder, W. F. und Grossman, A. D.** (2001). In vivo effects of sporulation kinases on mutant Spo0A proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **183** (22): 6573–6578.
- Rahmer, R., Heravi, K. M. und Altenbuchner, J.** (2015). Construction of a super-competent *Bacillus subtilis* 168 using the  $P_{mtlA}$ -*comKS* inducible cassette. *Front Microbiol* **6** : 1431.
- Rao, C. V., Glekas, G. D. und Ordal, G. W.** (2008). The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends Microbiol* **16** (10): 480–487.
- 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.
- Redfield, R. J.** (1993a). Evolution of natural transformation testing the DNA repair hypothesis in *Bacillus subtilis* and *Haemophilus influenzae*. *Genetics Society of America* **133** : 755–761.
- Redfield, R. J.** (1993b). Genes for breakfast: the have-your-cake-and-eat-it-too of bacterial transformation. *J Hered* **84** (5): 400–404.
- 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** (Pt 12) : 3419–3429.

**Reizer, J., Sutrina, S. L., Wu, L. F., Deutscher, J., Reddy, P. und Saier, M. H.** (1992). Functional interactions between proteins of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267** (13): 9158–9169.

**Roggiani, M. und Dubnau, D.** (1993). ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J Bacteriol* **175** (10): 3182–3187.

**Ryter, A.** (1965). Etude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **108** : 40–60.

**Sadaie, Y. und Kada, T.** (1983). Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol* **153** (2): 813–821.

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

**Sanchez, H., Carrasco, B., Ayora, S. und Alonso, J. C.** (2007). Homologous Recombination in Low dC + dG Gram-Positive Bacteria. In: Andrés Aguilera und Rodney Rothstein (Hg.): *Molecular Genetics of Recombination*, Bd. 17. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Topics in Current Genetics): 27–52.

**Sanchez, H., Kidane, D., Castillo Cozar, M., Graumann, P. L. und Alonso, J. C.** (2005). Recruitment of *Bacillus subtilis* RecN to DNA Double-Strand Breaks in the Absence of DNA End Processing. *J Bacteriol* **188** (2): 353–360.

**Saunders, C. W. und Guild, W. R.** (1981). Pathway of plasmid transformation in pneumococcus: open circular and linear molecules are active. *J Bacteriol* **146** (2): 517–526.

**Schultz, D., Wolynes, P. G., Jacob, E. B. und Onuchic, J. N.** (2009). Deciding fate in adverse times Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *PNAS* **106** (50): 21027–21034.

**Serror, P. und Sonenshein, A. L.** (1996a). CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J Bacteriol* **178** (20): 5310–5315.

**Serror, P. und Sonenshein, A. L.** (1996b). Interaction of CodY, a novel *Bacillus subtilis* DNA-binding protein, with the *dpp* promoter region. *Mol Microbiol* **20** (4): 843–852.

**Setlow, P.** (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol* **15** (4): 172–180.

**Shafikhani, S. H., Mandic-Mulec, I., Strauch, M. A., Smith, I. und Leighton, T.** (2002). Postexponential regulation of *sin* operon expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184** (2): 564–571.

**Sinderen, D. van, Luttinger, A., Kong, L., Dubnau, D., Venema, G. und Hamoen, L.** (1995). *comK* encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **15** (3): 455–462.

**Siranosian, K. J. und Grossman, A. D.** (1994). Activation of *spo0A* transcription by Sigma H is necessary for sporulation but not for competence in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176** (12): 3812–3815.

- Smits, W. K., Bongiorni, C., Veening, J.-W., Hamoen, L. W., Kuipers, O. P. und Perego, M.** (2007a). Temporal separation of distinct differentiation pathways by a dual specificity Rap-Phr system in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **65** (1): 103–120.
- Smits, W. K. und Grossman, A. D.** (2010). The transcriptional regulator Rok binds A+T-rich DNA and is involved in repression of a mobile genetic element in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **6** (11): e1001207.
- Smits, W. K., Hoa, T. T., Hamoen, L. W., Kuipers, O. P. und Dubnau, D.** (2007b). Antirepression as a second mechanism of transcriptional activation by a minor groove binding protein. *Mol Microbiol* **64** (2): 368–381.
- Solomon, J. M. und Grossman, A. D.** (1996). Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet* **12** (4): 150–155.
- Solomon, J. M., Lazazzera, B. A. und Grossman, A. D.** (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **10** (16): 2014–2024.
- Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A. und Grossman, A. D.** (1995). Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **9** (5): 547–558.
- Souza, B. M., Castro, Thiago Luiz de Paula, Carvalho, Rodrigo Dias de Oliveira, Seyffert, N., Silva, A., Miyoshi, A. und Azevedo, V.** (2014).  $\sigma$ (ECF) factors of gram-positive bacteria: a focus on *Bacillus subtilis* and the CMNR group. *Virulence* **5** (5): 587–600.
- Spizizen, J.** (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *PNAS* **44** : 1072–1078.
- Stanley, N. R. und Lazazzera, B. A.** (2005). Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol Microbiol* **57** (4): 1143–1158.
- Stewart, G. J. und Carlson, C. A.** (1986). The biology of natural transformation. *Annu Rev Microbiol* **40** : 211–235.
- Strauch, M. A., Spiegelman, G. B., Perego, M., Johnson, W. C., Burbulys, D. und Hoch, J. A.** (1989). The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *EMBO J* **8** (5): 1615–1621.
- Tan, I. S. und Ramamurthi, K. S.** (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental microbiology reports* **6** (3): 212–225.
- Tortosa, P. und Dubnau, D.** (1999). Competence for transformation: a matter of taste. *Curr Opin Microbiol* **2** (6): 588–592.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J. und Dubnau, D.** (1998). Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J* **17** (22): 6730–6738.
- Turgay, K., Hamoen, L. W., Venema, G. und Dubnau, D.** (1997). Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **11** (1): 119–128.

- Veening, J.-W., Igoshin, O. A., Eijlander, R. T., Nijland, R., Hamoen, L. W. und Kuipers, O. P.** (2008a). Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Mol Syst Biol* **4** : 184.
- Veening, J.-W., Smits, W. K. und Kuipers, O. P.** (2008b). Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **62** (1): 193–210.
- Verhamme, D. T., Murray, E. J. und Stanley-Wall, N. R.** (2009). DegU and Spo0A jointly control transcription of two loci required for complex colony development by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **191** (1): 100–108.
- Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D. und Powers, D. W.** (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407** (6806): 897–900.
- Weinrauch, Y., Penchev, R., Dubnau, E., Smith, I. und Dubnau, D.** (1990). A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes Dev* **4** (5): 860–872.
- Wenzel, M.** (2013). Charakterisierung des Regulators ManR und die Anwendung des Mannose Expressionssystems in *Bacillus subtilis*. Universität Stuttgart, Stuttgart. Industrielle Genetik.
- Wenzel, M. und Altenbuchner, J.** (2015). Development of a markerless gene deletion system for *Bacillus subtilis* based on the mannose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Microbiology* **161** (10): 1942–1949.
- 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.
- Wojciechowski, M. F., Hoelzer, M. A. und Michod, R. E.** (1988). DNA Repair and the evolution of Transformation in *Bacillus subtilis*. *Genetics Society of America* **118** : 31–39.
- Yadav, T., Carrasco, B., Myers, A. R., George, N. P., Keck, J. L. und Alonso, J. C.** (2012). Genetic recombination in *Bacillus subtilis*: a division of labor between two single-strand DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **40** (12): 5546–5559.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33** (1): 103–119.
- Yasumura, A., Abe, S. und Tanaka, T.** (2008). Involvement of nitrogen regulation in *Bacillus subtilis* *degU* expression. *J Bacteriol* **190** (15): 5162–5171.
- Young, F. E. und Spizizen, J.** (1961). Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81** (5): 823–829.
- Zadrazil, S. und Sponar, J.** (1980). DNA, recombination, interactions, and repair. Elsevier Ltd.
- Zapf, J., Madhusudan, M., Grimshaw, C. E., Hoch, J. A., Varughese, K. I. und Whiteley, J. M.** (1998). A source of response regulator autophosphatase activity: the critical role of a residue adjacent to the Spo0F autophosphorylation active site. *Biochemistry* **37** (21): 7725–7732.

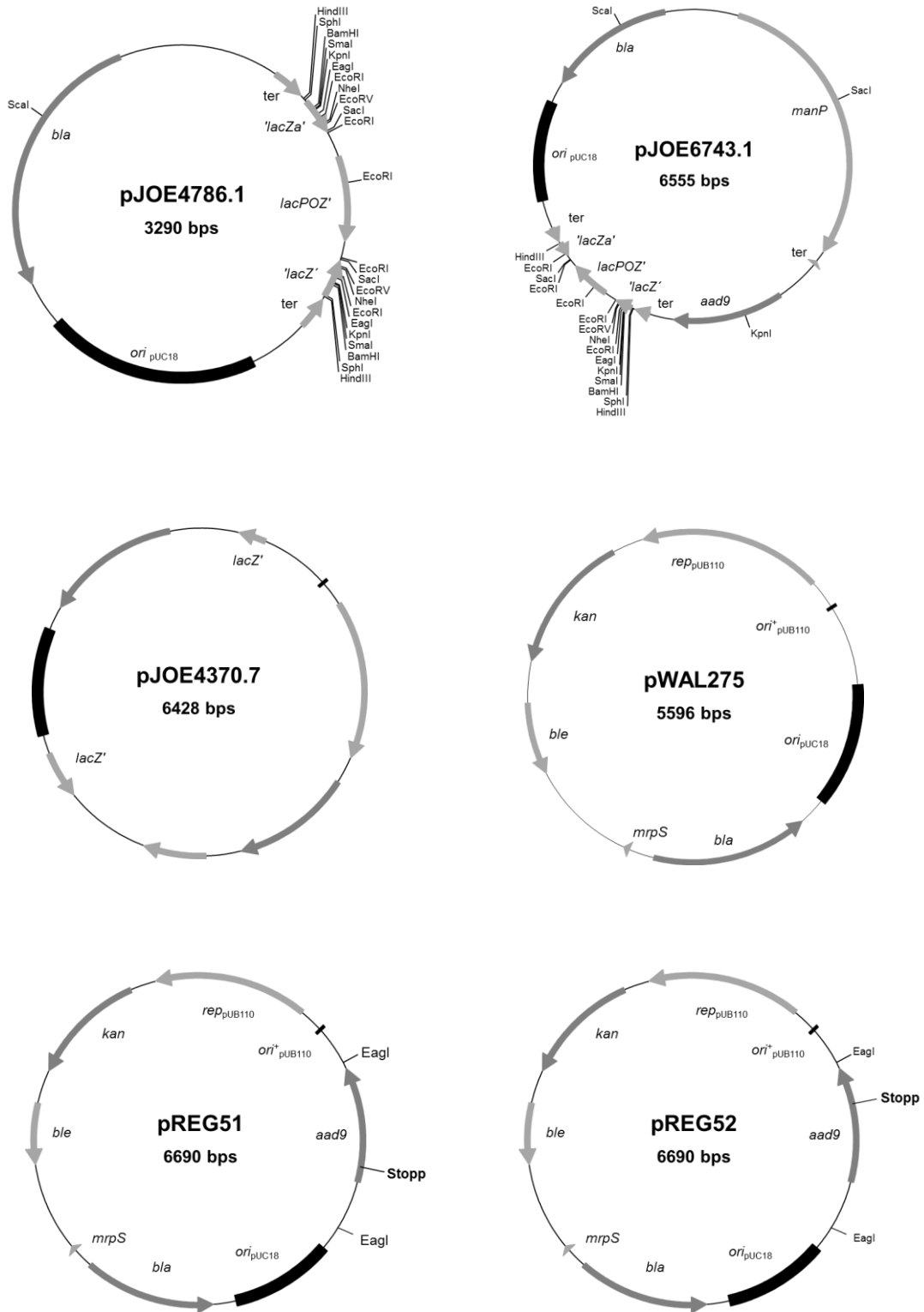
**Zellmeier, S., Zuber, U., Schumann, W. und Wiegert, T.** (2003). The Absence of FtsH Metalloprotease Activity Causes Overexpression of the W-Controlled *pbpE* Gene, Resulting in Filamentous Growth of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185** (3): 973–982.

**Zhang, X.-Z. und Zhang, Y.-H. P.** (2011). Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. *Microb Biotechnol* **4** (1): 98–105.

**Zweers, J. C., Barák, I., Becher, D., Driessen, A. J., Hecker, M., Kontinen, V. P., Saller, M. J., Vavrová, L. und van Dijk, J. M.** (2008). Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microbial cell factories* **7** : 10.

## 6 Anhang

### 6.1 Plasmidkarten



6.2 Sequenz des *trpC* Gens von *B. subtilis* 168

```

1 atgcttgaaa aaatcatcaa acaaaaagaaa gaagaagtga aaacactggt tctgcccgtga gacgagcctt togagaaaag ttcatttaaag gaggcgcctgg caagcccggaa togttttacc gggttgattg
taagaacttt tttagtagtt tgtttttctt cttcttcaact tttgtgacca agaagggccat ctogtcggaa agctctttgc aagtaaatcc ctcogcgacc gttcgggctt agccaaatag cccaactaac
>>.....trpC.....>
m l e k i i k q k k e e v k t l v l p v e q p f e k r s f k e a l a s p n r f i g l i

131 ccgaagtga gaaagcatcg ccgtcaaaa ggcttattaa agagatgttt gtaacctgic agattgcaaa agactatgag gctgcgaagg cagatgcgat ttcctgttta acagacacc cgttttttca
ggcttcaact cttctgtagc ggcagttttc ccgaataatt tctctcaaaa catggacacg tctaaagttt totgatactc gacgcttcc gctacgcta aaggcaaaat tgtctgtggg gcaaaaaagt
>>.....trpC.....>
a e v k k a s p s k g l i k e d f v p v q i a k d y e a a k a d a i s v l t d t p f f

261 aggggaaac agctatttat cagacgtaaa cgtgctggtt togatctctg tacttagaaa agattttatt gattctcttc aagtagaga atcaagaaga atcggagcgg atgccatatt gttaatggcc
tccccttttg togataaata gctctgactt cgcacgacaa agctaaaggac atgaatcttt tctaaaataa ctaagagaag ttcactctct tagttcttct tagctctgoc taoggtataa caattagccg
>>.....trpC.....>
q g e n s y l s d v k r a v s i p v l r k d f i d s l q v e e s r r i g a d a i l l i g

391 gagtgcttg atcccttaca ccttcaatgaa ttatctcttg aagcaggtga aaaggggatg gaactgttag tggaggttca tgatgcatac acgtagaac aatattgaa agttttcaac cccgacatc
ctccacgaac taggaaatgt ggaagtactt aatatagaac ttcttcaact ttccctcac ctgcacatc acctccaagt actacgtagt tgcgatcttg ttataaact tcaaaagt ggctgttag
>>.....trpC.....>
e v l d p l h l h e l y l e a g e k g m d v l v e v h d a s t l e q i l k v f t p d i

521 tcggcgtaaa taatcgaac ctaaaaactg ttgaacatc tgtaaacgac acagacaaa tcgcatctct cgttccgaaa gaatccttgc ttgtcagcga aagcgaact ggcttttag acatattaac
agccgcatc attagcttg gatttttga aactttgtg acattctgc tctctgttt agcgtagaga gcaaggtttt cttaggaac aacagctgct ttgccttag ccaagaatc ttgtaaatg
>>.....trpC.....>
l g v n n r n l k t f e t s v k q t e q i a s l v p k e s l l v s e s g i g s l e h l

651 atttgcaat gaacatggg ccgacgtctt acttatcgtt gaatcattga tgagacaaac ttctcagcgt aaagcaatc atgctttgtt tagggagtga
taaacagtta cttgtacccc gcctcagaca tgaatagcaa cttagtaact actctgtttg aagatgocaa ttctgttagg taagaaacaa atccctcaact
>>.....trpC.....>
t f v n e h g a r a v l i g e s l m r q t s q r k a i h a l f r e -

                                     SspI

```

6.3 Sequenz des *trpC* Gens von *B. subtilis* KM0

```

1 atgcttgaaa aaatcatcaa acaaaaagaaa gaagaagtga aaacactggt tctgcccgtga gacgagcctt togagaaaag ttcatttaaag gaggcgcctgg caagcccggaa togttttacc gggttgattg
taagaacttt tttagtagtt tgtttttctt cttcttcaact tttgtgacca agaagggccat ctogtcggaa agctctttgc aagtaaatcc ctcogcgacc gttcgggctt agccaaatag cccaactaac
>>.....trpC.....>
m l e k i i k q k k e e v k t l v l p v e q p f e k r s f k e a l a s p n r f i g l i

131 ccgaagtga gaaagcatcg ccgtcaaaa ggcttattaa agagatgttt gtaacctgic agattgcaaa agactatgag gctgcgaagg cagatgcgat ttcctgttta acagacacc cgttttttca
ggcttcaact cttctgtagc ggcagttttc ccgaataatt tctctcaaaa catggacacg tctaaagttt totgatactc gacgcttcc gctacgcta aaggcaaaat tgtctgtgg gcaaaaaagt
>>.....trpC.....>
a e v k k a s p s k g l i k e d f v p v q i a k d y e a a k a d a i s v l t d t p f f

261 aggggaaac agctatttat cagacgtaaa cgtgctggtt togatctctg tacttagaaa agattttatt attgattctc ttaagtaga ggaatcaaga agaactggag cggatgccat attgttaatc
tccccttttg togataaata gctctgactt cgcacgacaa agctaaaggac atgaatcttt tctaaaataa taactaaag aagttcaatc ccttagttct tottagctc gctcaagcga taacaatag
>>.....trpC.....>
q g e n s y l s d v k r a v s i p v l r k d f i d s l q v e e s r r i g a d a i l l i

391 ggcgaggtgc ttgatccctt acaccttcat gaattatata ttgaagcagg tgaagggggg atggagctgt tagtggaggt tcatgatgca tcaacgctag acaaatatt gaaagtgttc acaccggaca
ccgtctcaac aactagggaa tgtggaagta cttaatatag aactctgctc acttttccc tactctgaca atcaactcca agtactactt agttgcgctc ttgtttataa ctttcaaac tgtgggctgt
>>.....trpC.....>
g e v l d p l h l h e l y l e a g e k g m d v l v e v h d a s t l e q i l k v f t p d

521 ttctcggcgt aaataatcga aacctaaaaa cgtttgaac atctgtaaac cagacagaac aaatgcatac tctctctcag aaagaatcct tgcttgcag cgaagcggga atcggttctt tagaacatt
aagagccgca tttattagct ttgattttt gcaactttg tagacatctc gctctctctg tttagcgtag agagcaagc ttcttagga acaaacagtc gotttgcct tagccaagaa atctgtgaaa
>>.....trpC.....>
i l g v n n r n l k t f e t s v k q t e q i a s l v p k e s l l v s e s g i g s l e h

651 aacattttgc aatgaacatg ggcgcgagc tgtacttate ggtgaatcat tgatgagaca aactctcag cgtaagcaa tccatgcttt gtttagggag tga
ttgtaaacag ttaactgtac cccgcgctg acatgaatg ccaacttaga actactctgt ttgaagatc gattttcgtt aggtacgaaa caaatccctc act
>>.....trpC.....>
l t f v n e h g a r a v l i g e s l m r q t s q r k a i h a l f r e -

```



## 7 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Ralf Mattes möchte ich mich für die mir zur Verfügung gestellten Mittel zur Bearbeitung des Themas, für die Erstellung des Erstgutachtens sowie die Korrektur meines Manuskriptes bedanken.

Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Siemann-Herzberg bedanke ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Josef Altenbuchner für die Betreuung dieser Arbeit, Diskussionen und Ratschläge sowie die Korrektur meines Manuskriptes.

Herrn Dr. Stephan Eisler vom Institut für Zellbiologie und Immunologie möchte ich danken für die Hilfsbereitschaft, Tipps und Ratschläge bei der Konfokalmikroskopie.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen vom IIG möchte ich mich für die Zusammenarbeit und netten Momente bedanken. Ein besonderer Dank gilt Kambiz für die Hilfe und Unterstützung bei der Anfertigung meines Papers.

Ich danke meinem Mentor Herr Dr. Johannes Kehle für die motivierenden und hilfreichen Gespräche.

Von ganzen Herzen danke ich meiner Familie für die dauerhafte Unterstützung und Motivation sowie bei Dirk, der immer für mich da war und mir die nötige Kraft gab.



## 8 Lebenslauf

### **Regine Franzen (geb. Rahmer)**

Geboren am 07.03.1986 in Böblingen

#### **Schulische Ausbildung:**

- 1992 – 1996      Grundschule Filderstadt Bonlanden
- 1996 – 2005      Eduard-Spranger-Gymnasium, Filderstadt  
Abitur

#### **Akademische Ausbildung:**

- 2005 – 2011      Studium der Biologie (Diplom)  
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- Diplomarbeit am Interfakultären Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Tübingen, zum Thema "Verschiedene Mechanismen zur Aktivierung des Response Regulators SaeR in *Staphylococcus aureus*"
- 2012 – 2017      Wissenschaftliche Mitarbeiterin mit der Möglichkeit zur Anfertigung der Promotion bei Prof. Dr. Ralf Mattes am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart

