



**Regulation der Lösungsmittelbildung in  
*Clostridium acetobutylicum* durch DNA-  
bindende Proteine**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.  
der Fakultät für Naturwissenschaften  
der Universität Ulm

vorgelegt von  
Bettina Michaela Schiel  
aus Andernach

Ulm 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm angefertigt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

Referent: Prof. Dr. Peter Dürre

Koreferent: HD Dr. Ulrike Gerischer

Tag der Prüfung:

*Nicht  
Weil es schwer ist  
Wagen wir es nicht*

*Sondern weil  
Wir es nicht wagen  
Ist es schwer*

(Seneca)

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Organismen, Plasmide und Oligodesoxynukleotide</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Zellanzucht</b>	<b>16</b>
2.2.1 Nährmedien	16
2.2.1.1 LB- ( <i>Luria-Bertani</i> -) Medium (Sambrook et al., 2001)	16
2.2.1.2 Phosphatlimitiertes Minimalmedium, MES-gepuffert (Bertram et al., 1990)	16
2.2.1.3 SOB-Medium (Sambrook et al., 2001)	17
2.2.1.4 TB-Medium (Sambrook et al., 2001)	17
2.2.1.5 2x YTG-Medium (Oultram et al., 1988; mod.)	17
2.2.2 Nährmedien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.2.2.1 SD- ( <i>synthetic dropout</i> ) Medium	18
2.2.2.2 YPD-Medium	18
2.2.3 Medienzusätze	19
2.2.4 Stammhaltung	20
2.2.5 Anzuchtbedingungen	20
2.2.6 Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern	21
2.2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte	21
2.2.6.2 Gaschromatographische Analytik von Produkten	21
<b>2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>22</b>
2.3.1 Behandlung von Geräten und Lösungen	22
2.3.2 Wasser, Puffer und Lösungen	22
<b>2.4 Isolierung von Nukleinsäuren</b>	<b>24</b>
2.4.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>C. acetobutylicum</i> (Bertram und Dürre, 1989; mod.)	24
2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	24
2.4.2.1 Isolierung von Gesam-RNA (Oelmüller et al., 1990; mod.)	25

2.4.2.2	Isolierung von RNA mit dem 'RNeasy Mini Kit'	25
2.4.3	Isolierung von Plasmid DNA	26
2.4.3.1	Mini-Präparation aus <i>E. coli</i> mit dem 'GFX™ Micro Plasmid Prep Kit'	26
2.4.3.2	Midi-Präparation aus <i>E. coli</i> (Sambrook et al., 2001)	26
2.4.3.3	Mini-Präparation aus <i>C. acetobutylicum</i> mit dem 'GFX™ Micro Plasmid Prep-Kit'	27
2.4.3.4	Schnellnachweis von Plasmiden in <i>E. coli</i> ( <i>cracking</i> )	27
2.4.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
<b>2.5</b>	<b>Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren</b>	<b>28</b>
2.5.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	28
2.5.2	Ethanol-fällung	28
2.5.3	Isopropanol-fällung	29
2.5.4	Dialyse von DNA	29
2.5.5	Reinigung und Konzentrierung von DNA mittels Mikrokonzentratoren	29
2.5.6	Reinigung von DNA mit dem 'NucleoSpin Extract Kit'	29
2.5.7	Reinigung von DNA mit dem 'QIAquick PCR purification Kit'	30
2.5.8	Reinigung radioaktiv markierter DNA mit 'MicroSpin™ G-25 Columns'	30
2.5.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	30
<b>2.6</b>	<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>	<b>30</b>
2.6.1	Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	30
2.6.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	31
2.6.3	Größenbestimmung und Abschätzung der Konzentration von Nukleinsäuren	32
<b>2.7</b>	<b>Enzymatische Modifikation von DNA</b>	<b>32</b>
2.7.1	Restriktionsspaltung von DNA	32
2.7.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (Sambrook et al., 2001)	32
2.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.7.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	33
<b>2.8</b>	<b>PCR-Techniken</b>	<b>33</b>
2.8.1	Standard-PCR	33
2.8.2	PCR-vermitteltes Einfügen von Restriktionsschnittstellen	34
2.8.3	RT-PCR	35
2.8.4	LFH-PCR	35
<b>2.9</b>	<b>Transformation</b>	<b>37</b>
2.9.1	Transformation von <i>E. coli</i> (Inoue et al., 1990)	37
2.9.2	Elektroporation von <i>E. coli</i> (Dower et al., 1988)	38

2.9.3	Elektroporation von <i>C. acetobutylicum</i> (Nakotte et al., 1998; mod.)	38
2.9.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> (Ito et al. 1983; Schiestl und Gietz, 1989; Hill et al., 1991; Gietz et al., 1992)	40
<b>2.10</b>	<b>RNA-Transfer auf Nylonmembran (<i>Northern blot</i>)</b>	<b>40</b>
<b>2.11</b>	<b>RNA-Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde</b>	<b>41</b>
<b>2.12</b>	<b>Sequenzierung von Plasmid-DNA mit dem 'LI-COR®-Sequencer'</b>	<b>42</b>
<b>2.13</b>	<b>Heterologe Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i></b>	<b>43</b>
<b>2.14</b>	<b>Herstellung von Rohextrakten</b>	<b>44</b>
2.14.1	Zellaufschluß mit der 'French® Press'	44
2.14.2	Zellaufschluß mit dem 'RiboLyser'	44
<b>2.15</b>	<b>Isolierung bakterieller Membran- und Cytosolproteine</b>	<b>44</b>
<b>2.16</b>	<b>Reinigung und Konzentrierung von Proteinlösungen</b>	<b>45</b>
2.16.1	Dialyse	45
2.16.2	Pufferwechsel	45
2.16.3	Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)	45
<b>2.17</b>	<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen</b>	<b>46</b>
2.17.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; mod.)	46
2.17.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.17.3	Größenbestimmung von im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinen	48
<b>2.18</b>	<b>Proteinfärbungen</b>	<b>48</b>
2.18.1	Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969; mod.)	48
2.18.2	Silberfärbung (Blum et al., 1987; mod.)	49
<b>2.19</b>	<b>Phosphorylierung von Proteinen</b>	<b>50</b>
<b>2.20</b>	<b>Affinitätschromatographie</b>	<b>51</b>
2.20.1	DNA-Affinitätschromatographie	51
2.20.1.1	Kopplung der Sonde an 'Dynabeads® M-280 Streptavidin'	51
2.20.1.2	Durchführung der DNA-Affinitätsreinigung	52
2.20.2	Nickel-NTA-Affinitätschromatographie	52
<b>2.21</b>	<b>Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (<i>Western blot</i>) (Kyhse-Andresen, 1984)</b>	<b>54</b>

<b>2.22</b>	<b>Detektion rekombinanter <i>his-tag</i>-Fusionsproteine mit Antikörpern</b>	<b>54</b>
<b>2.23</b>	<b>Gelretardationsexperimente</b>	<b>55</b>
2.23.1	Gelretardationsexperimente am 'LI-COR®-Sequencer'	56
2.23.2	Nicht-radioaktive Gelretardationsexperimente	56
2.23.3	Radioaktive Gelretardationsexperimente	57
<b>2.24</b>	<b>Hefe-Ein-Hybrid-System (<i>yeast one-hybrid system</i>)</b>	<b>58</b>
2.24.1	Nachweis und Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität	58
2.24.1.1	<i>Colony-lift filter assay</i> (Breedon und Nasmyth, 1985)	58
2.24.1.2	Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität	59
<b>2.25</b>	<b>Sequenzanalysen und Internetrecherchen</b>	<b>60</b>
<b>2.26</b>	<b>Chemikalien, Gase, Enzyme, spezielle Produkte und Geräte</b>	<b>60</b>
2.26.1	Chemikalien und Gase	60
2.26.2	Spezielle Chemikalien, Enzyme und Produkte	61
2.26.3	Geräte	63
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur Regulation des <i>adc</i>-Gens</b>	<b>65</b>
3.1.1	Isolierung und computergestützte Charakterisierung von potentiellen Transkriptionsregulatoren des <i>adc</i> -Gens	66
3.1.1.1	Isolierung von an die Promoterregion des <i>adc</i> -Gens bindenden Proteinen	66
3.1.1.2	Computergestützte Analyse des Proteins AdcR	70
3.1.2	<i>adcR</i> -/ <i>adcS</i> -Expressionsstudien	76
3.1.3	Der Einfluß der Proteine AdcR und AdcS auf die Lösungsmittelbildung von <i>C. acetobutylicum</i>	78
3.1.3.1	Modulation der Expression der Gene <i>adcR</i> und <i>adcS</i> in <i>C. acetobutylicum</i>	78
3.1.3.1.1	Konstruktion von <i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Plasmiden	78
3.1.3.1.2	Wachstumsversuche und gaschromatographische Charakterisierung der <i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Plasmid-tragenden <i>C. acetobutylicum</i> -Stämme	81
3.1.3.2	Inaktivierung der Gene <i>adcR</i> und <i>adcS</i> in <i>C. acetobutylicum</i>	83
3.1.3.1.1	Konstruktion von Integrationsplasmiden	83
3.1.3.1.2	Konstruktion von Deletionsplasmiden	87
3.1.4	Überproduktion und Reinigung des <i>his-tag</i> -Fusionsproteins AdcR bzw. AdcS	88
3.1.4.1	Klonierung des Gens <i>adcR</i> bzw. <i>adcS</i> in einen Überexpressionsvektor	88

3.1.4.2	Heterologe Produktion und native Reinigung des Proteins AdcR x 6His bzw. AdcS x 6His	90
3.1.4.3	Lokalisation des heterolog überproduzierten Proteins AdcR x 6His	93
3.1.5	Überproduktion und Reinigung des <i>his-tag</i> -Fusionsproteins Spo0A	94
3.1.6	Gelretardationsexperimente mit den Fusionsproteinen AdcR x 6His, AdcS x 6His und Spo0A x 6His	97
3.1.6.1	Untersuchung des <i>adc</i> -Promoterbereichs	97
3.1.6.2	Untersuchung des <i>adcR</i> -Promoterbereichs	107
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zur Regulation des <i>sol</i>-Operons</b>	<b>108</b>
3.2.1	Allgemeine Betrachtung des Hefe-Ein-Hybrid-Systems ( <i>yeast one-hybrid system</i> )	108
3.2.2	Anwendung des Hefe-Ein-Hybrid-Systems auf den Promoterbereich des <i>sol</i> -Operons und das Protein Spo0A	109
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>116</b>
<b>4.1</b>	<b>Lösungsmittelbildung in <i>Clostridium acetobutylicum</i></b>	<b>116</b>
<b>4.2.</b>	<b>Das monocistronische <i>adc</i>-Operon</b>	<b>117</b>
<b>4.3</b>	<b>Regulation des <i>adc</i>-Operons</b>	<b>118</b>
4.3.1	Regulation durch DNA-bindende Proteine	119
4.3.2	Potentielle Bindestellen der Proteine AdcR und AdcS	120
4.3.2.1	Bindung stromabwärts der -10-Region des <i>adc</i> -Gens	121
4.3.2.2	Heptamermotiv und Palindrom: Potentielle Bindestellen im <i>adc</i> - Promoterbereich?	121
4.3.3	Spezifität der Bindung der Proteine AdcR und AdcS	124
4.3.4	Funktionsanalyse des Proteins AdcR	126
4.3.4.1	AdcR, ein Mitglied der MerR-Proteinfamilie	126
4.3.4.2	AdcR, ein ToxR-ähnliches Protein?	129
4.3.4.3	ECF-Sigmafaktoren	131
4.3.5	AdcR-/AdcS-Homologe in <i>Bacillus subtilis</i>	132
<b>4.4</b>	<b>Das polycistronische <i>sol</i>-Operon</b>	<b>133</b>
<b>4.5</b>	<b>Regulation des <i>sol</i>-Operons</b>	<b>133</b>
4.5.1	Das Regulatorprotein Spo0A im Hefe-Ein-Hybrid-System	135
<b>5A.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>138</b>
<b>5B.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>141</b>

**6. LITERATUR** \_\_\_\_\_ **144**

Danksagung

Lebenslauf

## Abkürzungen

$\alpha$	Alpha
A	Adenin; Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AG	Aktiengesellschaft
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
$\beta$	Beta
B.	<i>Bacillus</i>
BHIS	<i>Brain-Heart-Infusion-Sorbitol</i>
Bidest.	zweifach destilliert
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Bettvolumen
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin; Kohlenstoff; Carboxy-
C.	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAC	<i>C. acetobutylicum chromosome</i> (Genom)
CAP	<i>C. acetobutylicum megaplasmid</i> pSOL1 (Megaplasmid pSOL1)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
Co	Kompanie
CoA	Coenzym A
<b>d</b>	Deoxy-; Schichtdicke
Da	Dalton
Del.	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure

DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
Dr.	Doktor
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<b>E.</b>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
<b>F</b>	Farad
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
<b>g</b>	Gramm
G	Guanin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
<b>h</b>	Stunde(n)
Hrsg.	Herausgeber
i. d. R.	in der Regel
inc.	<i>incorporated</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid
IRD	<i>infra-red detectable</i>
<b>k</b>	kilo- ( $10^3$ )
kBp	Kilobasenpaare
KG	Kommanditgesellschaft
Km	Kanamycin
<b>l</b>	Liter
LB	<i>Luria-Bertani</i>
log	dekadischer Logarithmus
ln	natürlicher Logarithmus
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
m	Meter; milli- ( $10^{-3}$ )
M	molar (mol/l); Mega-
max.	maximal
MES	Morpholinopropansulfonsäure ('Pufferan')
min	Minute(n)
Mitt.	Mitteilung
MCS	Multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
MLS <sup>r</sup>	Macrolid-Lincosamid-Streptogramin-B-Resistenz
mod.	modifiziert
mol	mol(e) Stoffmenge ( $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen)

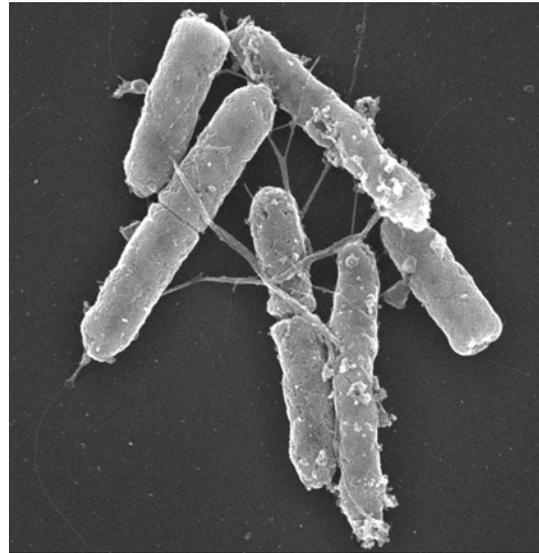
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	nano- ( $10^{-9}$ )
N	Amino-, Normal
NAD(P)[H]	Nikotinamidadenindinukleotid (-2'-phosphat) [reduziert]
NCIMB	<i>National Collection of Industrial and Marine Bacteria</i>
Ni	Nickel
NTA	Nitrilotrichloressigsäure
$\Omega$	Ohm
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF/ <i>orf</i>	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
ori	origin of replication (Replikationsursprung)
p	para-; pico- ( $10^{-12}$ ); Plasmid
P	Promoter
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pers.	persönlich(e)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-Ethan-Sulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pos.	Position
Prof.	Professor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r	resistent
®	<i>registered</i> (eingetragenes Warenzeichen)
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
$\sigma$	Sigma
s	Sekunde(n)
s	sensitiv
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
SOE	<i>splicing by overlap extension</i>
sog.	sogenannt

---

SSC	Standard-Saline-Citrat
STE	Saccharose-Tris-EDTA
<b>t</b>	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
™	<i>trade mark</i> (Handelsmarke)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
<b>U</b>	Einheiten ( <i>units</i> ); Uracil
u. a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
<b>W</b>	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galactosid
YT	<i>Yeast Tryptone</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## 1. Einleitung

***Clostridium acetobutylicum*** (Abb. 1) ist ein Gram-positives, strikt anaerobes, endosporenbildendes Bodenbakterium, das sich durch einen biphasischen Gärungsstoffwechsel auszeichnet. Zuckerhaltige Substrate werden in der ersten Phase des Stoffwechsels, der mit der logarithmischen Phase des Wachstums einhergeht, primär zu den Säuren Acetat und Butyrat umgesetzt, während in der zweiten Phase des Stoffwechsels die Lösungsmittel Aceton und Butanol gebildet werden. Die Umstellung des Stoffwechsels von Säure- auf Lösungsmittelproduktion erfolgt beim Übergang in die stationäre Phase des Wachstums und wird als *shift* bezeichnet (zur Übersicht siehe **Abb. 2**). Die Lösungsmittelproduktion sichert dem Organismus in der Natur das Überleben und verschafft ihm in der Biotechnologie eine große Bedeutung.



**Abb. 1** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, eigene Herstellung

Eine zu hohe Konzentration an Säuren, vor allem Butyrat, gefährdet das Überleben des Organismus, da der Protonengradient über der Cytoplasmamembran zusammenbrechen würde. An diesem Punkt erfolgt das Umschalten des Stoffwechsels auf die Produktion der neutralen Lösungsmittel, wobei ein Teil der Säuren wieder aufgenommen wird. Gleichzeitig mit der Lösungsmittelbildung wird die Endosporenbildung initiiert, die das Überleben des Organismus sichert, falls die Butanolkonzentration in der Umgebung über 2 % (Dürre et al., 2002) steigen sollte. Eine solche Butanolkonzentration wäre ebenfalls toxisch für den Organismus. Die Lösungsmittelbildung gibt dem Organismus somit genügend Zeit die Endosporenbildung einzuleiten und damit sein Überleben zu sichern (Dürre et al., 2002).

Bereits 1862 berichtete Pasteur von einer, auf der Aktivität von Mikroorganismen beruhenden, Bildung von Butanol und 1904 beschrieb Schardinger die Bildung von Aceton durch mikrobielle Aktivität. Angetrieben durch die Anfang des 20. Jahrhunderts auftretende Verknappung von Naturkautschuk und das damit steigende Interesse an der Herstellung synthetischen Gummis ausgehend vom Ausgangsstoff Butadien, gewonnen aus Butanol, wurde 1914 von Weizmann ein Butanol und Aceton bildender Stamm BY beschrieben (Gabriel, 1928). Dieser Stamm erhielt später den Namen *Clostridium acetobutylicum*. Während der

Weltkriege konzentrierte sich das Interesse überwiegend auf die Produktion von Aceton, das in großen Mengen für die Herstellung von rauchlosem Schießpulver notwendig war. Nach Beendigung der Kriege kehrte sich das Interesse wieder zugunsten von Butanol um, das nun in der Automobilindustrie bei der Herstellung von schnelltrocknenden Lacken als Lösungsmittel diente. Bis 1950 wurden die beiden Lösungsmittel Aceton und Butanol großindustriell durch Vergärung von Kartoffeln, Getreide, Mais und Melasse durch verschiedene *C. acetobutylicum* Stämme hergestellt. 1945 wurden 66 % des Butanols und 10 % des Acetons, das in den USA benötigt wurde, auf diesem Weg gewonnen (Dürre und Bahl, 1996). Industriell stellte der biotechnologische Prozeß der Aceton- und Butanolproduktion damit den zweitgrößten bakteriellen Prozeß nach der Ethanolproduktion durch *Saccharomyces cerevisiae* dar. Die Stämme, die zur Produktion der Lösungsmittel Anwendung fanden, wurden generell als *C. acetobutylicum* bezeichnet. Inzwischen wird aber, aufgrund neuer molekulargenetischer Grundlagen, in die vier Spezies *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. sacharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* (Keis et al., 1995; 2001a; 2001b) unterteilt. Um 1950 hingegen

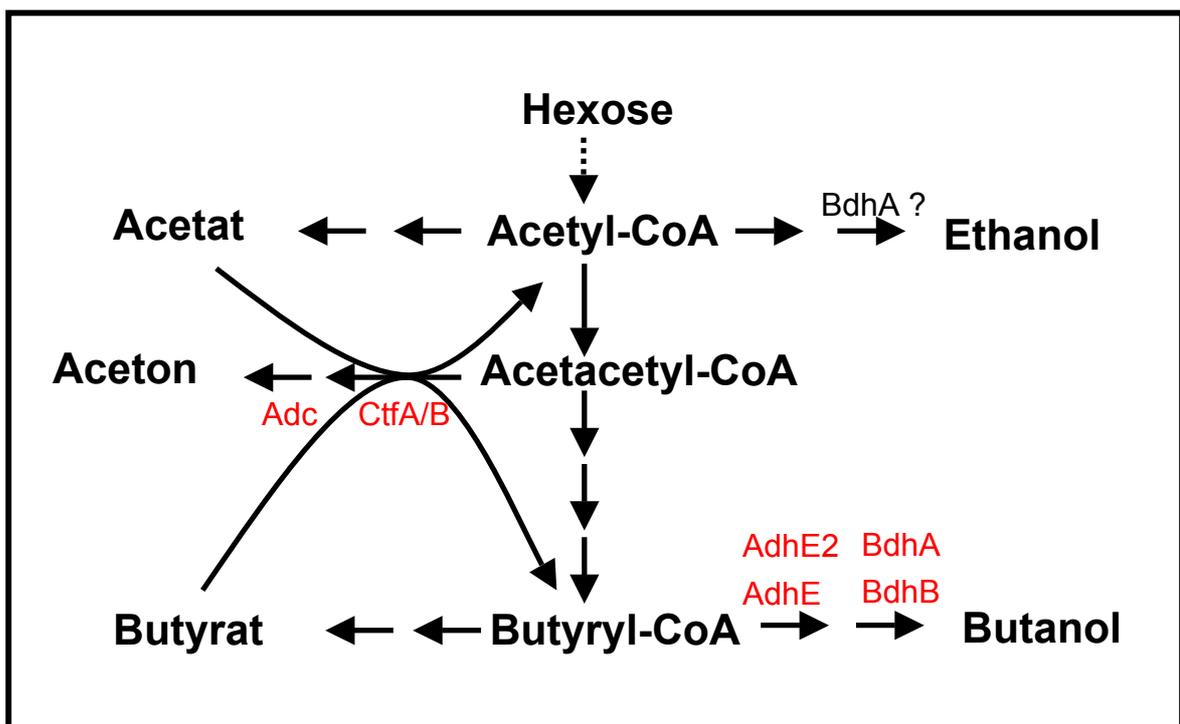


Abb. 2 Vereinfachte Darstellung des biphasischen Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum*

Adc: Acetacetat-Decarboxylase, CtfA/B: Acetacetyl-CoA: Acetat/Butyrat: CoA-Transferase, AdhE bzw. AdhE2: Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase E bzw. E2, BdhA bzw. BdhB: Butanol-Dehydrogenase A bzw. B

werden Aceton und Butanol hauptsächlich durch die expandierende petrochemische Industrie hergestellt. Die mikrobielle Produktion spielte kaum mehr eine Rolle; eine einzelne Firma in Südafrika produzierte bis 1982. (Alle Angaben zum geschichtlichen Ablauf aus Dürre und Bahl, 1996).

Die Ölkrise in den 70er Jahren, die Erkenntnis der Endlichkeit der Erdölvorräte und die Verteuerung des Rohstoffs Erdöl (**Abb. 3**) ließen das Interesse an der biotechnologischen Produktion von Aceton und Butanol mit Hilfe von nachwachsenden Rohstoffen in den letzten Jahren stark ansteigen. Ökonomische Analysen (Gapes, 2000) lassen eine Wiederaufnahme der Produktion in kleinerem Maßstab in Zukunft möglich erscheinen. Eine Pilotanlage in Österreich war bereits in Betrieb (Nimcevic und Gapes, 2000).

Bis hinein in die 50er Jahre wurde *C. acetobutylicum* industriell in biotechnologischen Verfahren eingesetzt, ohne daß genaue Kenntnisse über die physiologischen Vorgänge des Organismus bekannt waren. Um die biotechnologische Produktion von Aceton und Butanol gegenüber petrochemischen Verfahren der Lösungsmittelherstellung konkurrenzfähig zu machen, war es wichtig, die mikrobielle Synthese der Lösungsmittel und damit *C. acetobutylicum* wieder in den Mittelpunkt intensiver Forschungen zu stellen. Schwerpunktmäßig galt es dabei, der Unrentabilität des Prozesses, die in der geringen Butanol-toleranz des Bakteriums seine Begründung findet, durch Verbesserung bzw. Neuentwicklung der Verfahrenstechnik zu begegnen (Bahl et al., 1982; Godin und



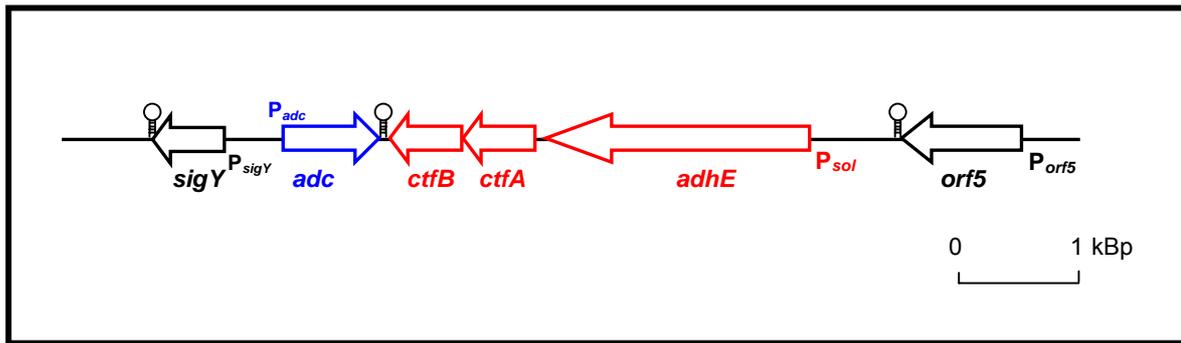
**Abb. 3** Preisentwicklung Erdöl (DIE ZEIT 14/05, 31.03.05, S. 27)

rote Kurve: realer Ölpreis in Preisen von 2003 in USD pro Barrel (=159 Liter); graue Kurve: nomineller Ölpreis in USD pro Barrel (=159 Liter)

Engasser, 1990). Diese Versuche, verschiedene Ansätze zur Isolierung butanol-toleranter Stämme (Lin und Blaschek, 1983) und Experimente zur Verwendung billiger organischer Abfallprodukte als Substrat (Shah et al., 1991) führten bisher jedoch nicht zu einer Konkurrenzfähigkeit gegenüber dem chemischen Prozeß. Einen weiteren Schwerpunkt bildeten die Untersuchungen bezüglich der Einflüsse verschiedener extra- und intrazellulärer Faktoren auf die Solventogenese. Zu diesen Faktoren zählen pH-Wert, Konzentration organischer Säuren, Limitierung von Phosphat bzw. Schwefel bei gleichzeitigem Überschuß an Glucose sowie interne ADP/ATP- bzw. NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnisse (Bahl et al., 1982; Gottschalk und Morris, 1981; Hüsemann und Papoutsakis, 1986; Jewell, 1986; Terraciano und Kashket, 1986; 1988; Grupe und Gottschalk, 1992). Keiner der genannten Parameter ist allein für die Initiation der Lösungsmittelbildung verantwortlich. Vielmehr sieht es so aus, als ob diese durch die Kombination mehrerer Faktoren hervorgerufen wird (Dürre et al., 1995; Ullmann et al., 1996). Den dritten Schwerpunkt schließlich bildet die biochemische Charakterisierung der an der Lösungsmittelbildung beteiligten Enzyme und die Identifizierung der beteiligten Gene bzw. Operone (zur Übersicht: Dürre et al., 1995; Bennett und Rudolph, 1995). Die Anwendung von molekularbiologischen Techniken auf Clostridien (Young et al., 1989) und letztendlich die 2001 veröffentlichte Sequenz des Genoms von *C. acetobutylicum* (Nölling et al., 2001) erleichtert die Forschung auf diesem Gebiet erheblich.

Die meisten der an der Lösungsmittelbildung direkt oder indirekt beteiligten Gene liegen separat vom Chromosom auf einem 192-kBp-großen Megaplasmid pSOL1 (Cornillot et al., 1997). Direkt an der Lösungsmittelbildung beteiligt sind die Gene der Acetacetyl-CoA: Acetat/Butyrat: CoA-Transferase (CoA-Transferase, *ctfA* und *ctfB*; Gerischer und Dürre, 1990; Petersen et al., 1993; Fischer et al. 1993), der Acetacetat-Decarboxylase (*adc*; Gerischer und Dürre, 1990; Peterson et al., 1993), der Butanol-Dehydrogenasen A und B (*bdhA* und *bdhB*; Peterson et al., 1991; Walter et al., 1992) und der Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase E mit dem membrangebundenen Elektronenüberträger OrfL (*adhE* und *orfL*; Fischer et al., 1993). Die Gene *orfL*, *adhE*, *ctfA* und *ctfB* bilden dabei das polycistronische *sol*-Operon, das entgegengesetzt zum *adc*-Operon orientiert ist. Ein Überblick über die wichtigsten Gene der Lösungsmittelbildung ist in **Abb. 4** gegeben.

Über die Regulation der Lösungsmittelbildung bzw., die Regulation der Gene, die an der Lösungsmittelbildung beteiligt sind, ist bis dato noch sehr wenig bekannt. Die Transkription nahezu aller an der Solventogenese beteiligten Gene erfolgt verstärkt bzw. ausschließlich im Zuge des Lösungsmittelshifts, was eine Regulation auf transkriptioneller Ebene nahelegt (Gerischer und Dürre, 1992; Walter et al., 1992; Sauer und Dürre, 1995). Die entsprechenden Regu-



**Abb. 4 Organisation und Umgebung des *sol*-Operons und des *adc*-Operons**

In der obigen Abbildung ist ein Ausschnitt des Megaplasmids pSOL1 dargestellt mit den Genen *sigY* (codiert für einen ECF-Sigmafaktor), *adc*, *ctfA* und *ctfB*, *adhE* und *orf5* (codiert für ein Enzym, das wahrscheinlich an der Proteinglykosylierung beteiligt ist).

lationsmechanismen und daran beteiligte Komponenten sind bisher noch weitgehend unbekannt. Als ein möglicher molekularer Regulationsmechanismus der Stoffwechsellumstellung konnte in den letzten Jahren für das *sol*-Operon, das *adc*-Gen und auch andere Gene des Fermentationsstoffwechsels der Einfluß der DNA-Topologie auf die Transkription gezeigt werden (Ullmann et al., 1996). Für das *sol*-Operon konnten bezüglich der Identifizierung von an der Regulation beteiligten Komponenten in den letzten Jahren einige neue Erkenntnisse gewonnen werden. Der intergene Bereich vor dem *sol*-Operons scheint der Ansatzpunkt der Regulation zu sein. In diesem Bereich finden sich drei repetitive Zehnersequenzen, von denen die dem Promoter am nächsten liegende Sequenz mit einem Spo0A-Bindemotiv überlappt und sich zwischen den beiden weiter stromaufwärts vom Promoter liegenden Sequenzen eine *cre*-Sequenz identifizieren läßt. Die Inaktivierung des Spo0A-Bindemotivs, die sog. 0A-Box, hat auf die Aktivierung des *sol*-Operons einen stark negativen Effekt, so daß angenommen werden kann, daß der globale Transkriptionsfaktor Spo0A eine Rolle bei der Regulation des *sol*-Operons spielt, wenn er auch nicht den eigentlichen Aktivator des Operons darstellt (Thormann et al., 2002, Hollerschwandner, 2003). Die Veränderung der nativen Sequenz des am weitesten stromaufwärts gelegenen Zehnermotivs hat eine Verminderung der Transkription des *sol*-Operons zur Folge, was sich durch die Veränderung der Lage der *cre*-Sequenz in der Sekundärstruktur erklären läßt. Die Sequenz ist nicht mehr für einen potentiellen Regulator zugänglich. Als ein möglicher Regulator konnte in diesem Fall CcpA identifiziert werden (Feustel, 2004). In dieser Arbeit galt es, die Bindung von Spo0A an den intergenen Bereich des *sol*-Operons mit Hilfe der Anwendung des Hefe Ein-Hybrid Systems zu untersuchen. Auch in der Promoterregion des *adc*-Gens lassen sich drei potentielle Spo0A-Bindestellen finden. Eine Zerstörung der 0A-Boxen führt zu einer Verminderung der Aktivität des *adc*-Promoters, die Induktion der Transkription während des Umschaltens auf

die Lösungsmittelbildung wird jedoch nicht beeinträchtigt (Ravagnani et al., 2000; Böhringer, 2003). Dies führt zu der Annahme, das mindestens ein weiterer Transkriptionsfaktor an der Regulation des *adc*-Operons beteiligt sein muß. Die Aufklärung dieser Frage war das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit.

Ein noch relativ neuer Aspekt zur Nutzung nicht-pathogener Clostridien bietet sich im Rahmen der Medizin an. *In vivo* verabreichte *Clostridium*-Sporen sind in der Lage, im hypoxischen Gewebe eines Tumors auszukeimen. Mit Hilfe gentechnisch veränderter Clostridien könnten auf diesem Weg gezielt Enzyme zum Tumor gebracht werden, die dort lokal beschränkt nicht toxische Vorstufen z. B. eines Chemotherapeutikums in ein wirksames Arzneimittel umsetzen. Auch vor diesem Hintergrund gewinnen die Untersuchungen zur Genregulation in Clostridien zunehmend an Bedeutung, wobei in diesem Zusammenhang vor allem die Regulation der Sporulation im Vordergrund steht. Der Nachweis, daß Spo0A sowohl an der Regulation der Sporulation, als auch an der Regulation der Lösungsmittelbildung beteiligt ist, macht deutlich, daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß Regulatoren, die im Zusammenhang mit der Lösungsmittelbildung gefunden werden, nicht auch auf die Sporulation einen Einfluß haben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Organismen, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten **Organismen** sind in **Tab. 1** dargestellt.

**Tab. 1 Organismen**

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp <sup>1)</sup>	Herkunft/Referenz
<b><i>Clostridium acetobutylicum</i></b>		
DSM 792	Typstamm	DSMZ <sup>2</sup> , Braun-schweig
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
BL 21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> , (DE3)	Novagen R&D Systems; Wiesbaden
ER2275	<i>trp-31, his-1, tonA2, rpsL104, supE44, xyl-7, mtl-2, metB1, e14<sup>-</sup> Δ(lac)U169, endA1, recA1, R(zbgZ10::Tn10)Tc<sup>S</sup>, Δ(mcr-hsd-mrr)114::1510, [F', proAB, laqI<sup>q</sup> ZΔM15 zzd::mini Tn10 (Km<sup>r</sup>)]</i>	Prof. Dr. E. T. Papoutsakis; Evanston, USA
XL1-Blue MRF'	<i>Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, [F', proAB, laqI<sup>q</sup>ZΔM Tn10 (Tc<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene GmbH, Heidelberg
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>		
YM4271	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-901, tyr1-501, gal4-Δ512, gal80-Δ538, ade5::hisG</i>	Liu et al., 1993
YM4271 [p53HIS]	Integration des Plasmids p53HIS ins Genom, His <sup>+</sup>	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp <sup>1)</sup>	Herkunft/Referenz
YM4271 [p53BLUE]	Integration des Plasmids p53BLUE ins Genom, Ura <sup>+</sup>	diese Arbeit
YM4271 [pHISi/BD]	Integration des Plasmids pHISi/BD ins Genom, His <sup>+</sup>	diese Arbeit
YM4271 [pLacZi/BD]	Integration des Plasmids pLacZi/BD ins Genom, Ura <sup>+</sup>	diese Arbeit

<sup>1)</sup> Für die Genotyp-Bezeichnungen siehe Bachmann (1990)

<sup>2)</sup> Deutsche Sammlung für von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Eingesetzte sowie in dieser Arbeit hergestellte **Plasmide** sind in **Tab. 2** aufgeführt.

**Tab. 2 Plasmide**

Plasmid	Größe und relevante Determinanten	Herkunft/Referenz
pAN1	<b>7,0 kBp</b> ; Cm <sup>r</sup> , $\phi$ 3tl, p15A oriR	Mermelstein und Papoutsakis, 1993
pIMP1	<b>4,6 kBp</b> ; Ap <sup>r</sup> , MLS <sup>r</sup> , ColE1 oriR, pIMP13 oriR+	Mermelstein et al., 1992
pETSPO	<b>5,1 kBp</b> ; Cm <sup>r</sup> , fragmentiertes <i>spo0A</i> mit dazwischen klonierter MLS <sup>r</sup> -Kassette für die Integration in das Chromosom	Harris et al., 2002
pETSPO*	<b>4,2 kBp</b> ; Cm <sup>r</sup> , pETSPO ohne 900 Bp- <i>repL</i> -MCS-Fragment	Feustel, 2004
pLF3	<b>2,6 kBp</b> ; Cm <sup>r</sup> , pETSPO* ohne 1607 Bp <i>ermC-spo0A</i> -Fragmente	Feustel, 2004
pBS4	<b>5,1 kBp</b> ; pETSPO, nur <i>spo0A</i> ersetzt durch <i>adcR</i>	diese Arbeit

Plasmid	Größe und relevante Determinanten	Herkunft/Referenz
pBS5	<b>5,1 kBp</b> ; pETSPO, nur <i>spo0A</i> ersetzt durch <i>adcR</i>	diese Arbeit
pBS6	<b>5,2 kBp</b> ; pETSPO, nur <i>spo0A</i> ersetzt durch <i>adcS</i>	diese Arbeit
pBS7	<b>5,2 kBp</b> ; pETSPO, nur <i>spo0A</i> ersetzt durch <i>adcS</i>	diese Arbeit
pBS8	<b>5,2 kBp</b> ; pETSPO, nur <i>spo0A</i> ersetzt durch <i>adcS</i>	diese Arbeit
pBS9	<b>5,2 kBp</b> ; pETSPO, nur <i>spo0A</i> ersetzt durch <i>adcS</i>	
pET31(+)	<b>5,4 kBp</b> ; P <sub>tac</sub> , T7-Promoter, Ap <sup>r</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pSOA	<b>6,2 kBp</b> ; <i>spo0Ax6His</i> -Fusion in pET31(+)	Hollerschwandner, 2003
pET29a(+)	<b>5,4 kBp</b> ; P <sub>tac</sub> , T7-Promoter, Km <sup>r</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , f1 ori, <i>lacI</i>	Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach
pBS1	<b>6,2 kBp</b> , <i>adcSx6His</i> -Fusion in pET29(+)	diese Arbeit
pBS2	<b>6 kBp</b> , <i>adcRx6His</i> -Fusion in pET29(+)	diese Arbeit
pIMP121	<b>7,3 kBp</b> ; pADR110 (Δ stromaufwärts von P <sub>adc</sub> )	Böhringer, 2002
pIMP122	<b>7,3 kBp</b> ; pADR112 (Δ stromaufwärts von P <sub>adc</sub> )	Böhringer, 2002
pBS77	4,8 kBp; <i>ptb-buk</i> -Promoter als 122-Bp-EcoRI/NdeI-Fragment in pIMP1	diese Arbeit
pBS78	<b>5,2 kBp</b> ; <i>adcR</i> als 643-Bp-Fragment in <i>sense</i> -Orientierung in pBS77	diese Arbeit

Plasmid	Größe und relevante Determinanten	Herkunft/Referenz
pBS79	<b>5,2 kBp</b> ; <i>adcR</i> als 643-Bp-Fragment in <i>antisense</i> -Orientierung in pBS77	diese Arbeit
pBS80	<b>5,4 kBp</b> ; <i>adcS</i> als 751-Bp-Fragment in <i>sense</i> -Orientierung in pBS77	diese Arbeit
pBS81	<b>5,4 kBp</b> ; <i>adcS</i> als 751-Bp-Fragment in <i>antisense</i> -Orientierung in pBS77	diese Arbeit
pBS82	<b>6 kBp</b> ; <i>adcR/adcS</i> als 1399-Bp-Fragment in <i>sense</i> -Orientierung in pBS77	diese Arbeit
pBS83	<b>6 kBp</b> ; <i>adcR/adcS</i> als 1399-Bp-Fragment in <i>antisense</i> -Orientierung in pBS77	diese Arbeit
pHISi	<b>6,8 kBp</b> ; Vektor für die Integration am <i>HIS3</i> -Locus; trägt das <i>HIS3</i> -Reporter gen	CLONTECH Laboratories GmbH; Heidelberg
pHISi-1	<b>5,4 kBp</b> ; Vektor für die Integration der DNA-Bindestelle; <i>HIS3</i> -Reporter gen	CLONTECH Laboratories GmbH; Heidelberg
pLacZi	<b>6,9 kBp</b> ; Vektor für die Integration der DNA-Bindestelle; <i>lacZ</i> -Reporter gen	CLONTECH Laboratories GmbH; Heidelberg
p53HIS	<b>6,6 kBp</b> ; Positivkontrolle; p53-Bindestelle; <i>HIS3</i> -Reporter gen	CLONTECH Laboratories GmbH; Heidelberg
p53BLUE	<b>6,7 kBp</b> ; Positivkontrolle; p53-Bindestelle; <i>lacZ</i> -Reporter gen	CLONTECH Laboratories GmbH; Heidelberg
pGAD53m	<b>7,8 kBp</b> ; Positivkontrolle; p53-Gen zusammen mit GAL4 AD	CLONTECH Laboratories GmbH; Heidelberg
pGAD424	<b>6,6 kBp</b> ; Negativkontrolle bzw. AD-Klonierungsvektor	CLONTECH Laboratories GmbH; Heidelberg

Plasmid	Größe und relevante Determinanten	Herkunft/Referenz
pGAD424/spo0A	7,5 kBp; <i>spo0A</i> in pGAD424 (MCS)	diese Arbeit
pGAD424/orf5	7,5 kBp; <i>orf5</i> in pGAD 424 (MCS)	diese Arbeit
pHISi/BD	6,8 kBp; 33-Bp-Binderegion in pHISi	diese Arbeit
pHISi-1/BD	5,4 kBp; 33 Bp Binderegion in pHISi-1 (MCS)	diese Arbeit
pLacZi/BD	6,9 kBp; 33 Bp Binderegion in pLacZi (MCS)	diese Arbeit

<sup>1)</sup> Bei der Berechnung der Plasmidgrößen wurde mathematisch gerundet.

Die zur Amplifikation von DNA Fragmenten verwendeten **Oligodesoxynukleotide** (im weiteren Oligonukleotide oder *Primer*) sind in den folgenden Tabellen (**Tab. 3-Tab. 11**) entsprechend ihrer Verwendung in den Experimenten aufgelistet.

**Tab. 3 Primer für die DNA-Affinitätschromatographie (3.1.1.1)**

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonstiges
adcintdownbiot	TAATGTAAATATAAATAAATAGGACTAGAGGCC	5'-Biotinylierung
adcintupsal	<u>GTCGAC</u> CCTAAATTTAATGTTTAGC	<i>SalI</i>
adclangbiot	TTCATATCCTTCATAATCTGC	5'-Biotinylierung
IMP1	TGCAAGGCGATTAAGTTGGG	

Nicht komplementäre Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind **rot markiert** und unterstrichen.

Tab. 4 Primer für *adcR/adcS*-Expressionsstudien (3.1.2)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonstiges
37/38fw	CATAAGAAATATGAGTTATCTCAAG	
37/38rev	CTTTATCAACTTCCTCAACGGG	
36/37fw	ATCACCGTGTACTTTAGTTGTTCC	
36/37rev	GCATCTCTTGTTCTAAAAGTAAACGC	
gyrA-RT-for	GCAATGAGCGTTATAGTAAGCCGTGC	
GyrA-RT-rev	GCAGCAGCAGAGTCACCGTCAACCG	

Tab. 5 Primer zur Herstellung von Sonden für *Northern blot*-Experimente (3.1.2)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonstiges
adcRfw	TCTTGAGATAACTCATATTTCTTATGG	
adcRrev	AGCTATTCCTAGTTTTCTTATTAATACTACG	
cap0036fw	ATTGCAACAGGTTATATGTGTTTCAGGC	
cap0036rev	CTCATGTATAAAATGTCCAGAACC	

Tab. 6 Primer zur Herstellung von *sense*- und *antisense*-Plasmiden (3.1.3.1.1)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonstiges
KL08	gggAAT <u>caTatg</u> tcgACACTCCCTTTTACTATTT	<i>NdeI</i>
KL09	cG <u>gAattc</u> TATAAAATATAAATAATTTTC	<i>EcoRI</i>
AS136NdeI	GCCTTTTGTTTTTTA <u>catatg</u> AGATTTTTCTCACAC	<i>NdeI</i>
AS236NdeI	GATTTT <u>cAtATG</u> GAAGAAAAATTATCAGACG	<i>NdeI</i>
AS137NdeI	CGTCTGATAATTTTTCTTCCATTT <u>cAtAtg</u> CTCC	<i>NdeI</i>
AS237NdeI	GAATAGC <u>cATATG</u> GATGAAACTAATTTAATTTTC	<i>NdeI</i>
IRDIMP1	TGCAAGGCGATTAAGTTGGG	IRD800-Markierung

Nicht komplementäre Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind rot markiert und unterstrichen.

Tab. 7 Primer zur Herstellung von Integrationsplasmiden (3.1.3.2.1)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonstiges
36BamHI	GATTTT <u>ggAtcc</u> GAAGAAAAATTATCAGACG	BamHI
36EcoRI	GCCTTTTGTGTTTTT <u>gaaTtc</u> AGATTTTTCTCACAC	EcoRI
37BamHI	GAATAGC <u>ggatcc</u> GATGAAACTAATTTAATTTT	BamHI
37EcoRI	CGTCTGATAATTTTTCTTCCATTT <u>gAAttc</u> CTCC	EcoRI
ermc-eco81I-f	gcg <u>cctnagg</u> GTGAATGCGCAAAAGACATAATCG	Eco81I
ermc-eco81I-r	gcg <u>cctnagg</u> GGATGTATTCACTAATAGAATAAGAG	Eco81I
ermc-xhoI-f	gcg <u>ctcgag</u> GTGAATGCGCAAAAGACATAATCG	XhoI
ermc-xhoI-r	gcg <u>ctcgag</u> GGATGTATTCACTAATAGAATAAGAG	XhoI
RepL_eco_for	AGT <u>gaattc</u> CCGGGGATCCGTCGAC	EcoRI
RepL_eco_rev	ATCC <u>gaattc</u> CGGCATTAC	EcoRI

Nicht komplementäre Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind rot markiert und unterstrichen.

Tab. 8 Primer zur Herstellung von Deletionsplasmiden (3.1.3.2.2)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonstiges
catPfw	AATGTGGTATAATATCTTTGTTCCATTAGAGCG	
catPrev	GTTACAGACAAACCTGAAGTTAACTATTTATCAATTCC	
adcRdofwSal	AATATTA <u>gTcgAc</u> AACAGTAATTAAGATTGTC	Sall
adcRdorevcatP	cgctctaatgaacaaagatattataccacatt- GATATATATTGAAAATACAGCATCTCTTG	catP-Überhang
adcRupfwcatP	ggaattgataaatagttaacttcaggttgtctgtaac- TAGTTTCATCCATATAGCTATTCCCTCC	catP-Überhang
adcRuprevBamHI	CCTACTTCCAAAg <u>GAtcc</u> GCTATGAATACTAG	BamHI
cap0036dofwSall	AAGTTCTATT <u>GtcGaC</u> TCATCTATCCAGCC	Sall
cap0036dorevcatP	cgctctaatgaacaaagatattataccacatt- GAGGAAACAATATTACAATAGGCCCTAACTGC	catP-Überhang
cap0036upfwcatP	ggaattgataaatagttaacttcaggttgtctgtaac- GTTTCCTCCACCTATACTTCCGCTTCC	catP-Überhang
cap0036uprevBamHI	ACACCACC <u>ggaTCc</u> TGGATTTCTTCTTCC	BamHI

Nicht komplementäre Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind rot markiert und unterstrichen.

Tab. 9 Primer zur Klonierung in den Überexpressionsvektor pET29a(+) (3.1.4.1)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonstiges
ygaS1hinCl	GAATAGC <u>cATATG</u> GATGAAAC	<i>NdeI</i>
ygaS2rückCl	TCCTTT <u>AagcTt</u> TAGTGATAATTTTGATTTTAATTCTTCTAAAC	<i>HindIII</i>
yhbE1hinCl	GGAGATTTT <u>cAtATG</u> GAAGAATTATCAGACG	<i>NdeI</i>
yhbE2rückCl	CTCCACACT <u>aagcTt</u> TTTCATCAACCTTTTTGCAAAGTGCC	<i>HindIII</i>

Nicht komplementäre Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind **rot markiert** und unterstrichen.

Tab. 10 Primer zur Herstellung von Sonden für Gelretardationsexperimente (3.1.6)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonstiges
adcintlang2	AAAAGTCACCTTCCTAAATTTAATAATG	
imp2	ATATATGGTGTAATAATTTAC	
adcmit1	GATGAGCCCTTAGTCAGG	
adcmit2	CCTACTAAAGTATCTGAATCC	
bukmit1	TCTTAAAGCCAATAGTAAGTGG	
bukmit2	AACTGCTTTTTGATTTAATGCATGG	
bs-adc-fw	CCTATAAGAGACACTATATCG	
bs-adc-rw	GTTTAATTACTTCATCCTTTAAC	
adc-0A3-rw	CATTATAACACATATTG	
adc-0A3-fw	CATAAAAACACCTCCACATAAG	
adc-0A1-rw	ATAAAAGTACACTTCC	
adc-0A2-fw	GAATTTTTAGGAAGTGAC	
adcmit1biot	GATGAGCCCTTAGTCAGG	5'-Biotinylierung
bukmit1biot	TCTTAAAGCCAATAGTAAGTGG	5'-Biotinylierung
bs-adcfwbiot	CCTATAAGAGACACTATATCG	5'-Biotinylierung
adcR-spo0A-fw	ACATTGTTACGTTTGAATAGGAAAG	
adcR-spo0A-rw	TCTTTATCAACTTCCTCAACGG	
CPE-int-BS-for	AATTAACATTTCAACTTGATCTC	
CPE-int-r-pst1	gct <u>ctgcag</u> GCATTTTCGAACAACATTGG	<i>PstI</i>

Nicht komplementäre Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind **rot markiert** und unterstrichen.

Tab. 11 *Primer für Hefe-Ein-Hybrid-System-Experimente (3.2.2)*

<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>	<i>Sonstiges</i>
orf5-S-2Hy	CTTAATTT <u>GTCGAC</u> TTCTGAAATAATACTAC	<i>SalI</i>
orf5-E-2Hy	CATTTT <u>GAATTC</u> AAATCTCTTAACAAAGCTGTG	<i>EcoRI</i>
spo0A-Mal EcoRI	GAGTTA <u>GAATTC</u> GAAAGTAGAAAAATAAGTG	<i>EcoRI</i>
spo0A-Mal-PstI	CTTTTA <u>CTGCAG</u> TATTATTACATTAACTTAGCTAAC	<i>PstI</i>
spo0A-BS1	GGAC <u>GAATTCATCGAT</u> TACGCCAA <u>CCCGGG</u> AGG	<i>EcoRI, ClaI, SmaI</i>
spo0A-BS3	CCT <u>CCCGGG</u> TTGGCGTA <u>ATCGATGAATTC</u> GTCC	<i>SmaI, ClaI, EcoRI</i>

Restriktionsschnittstellen sind rot markiert und unterstrichen.

## 2.2 Zellanzucht

### 2.2.1 Nährmedien

Aerobe Flüssigmedien wurden nach der pH-Einstellung für mind. 20 min bei 121 °C und 1,2 bar Druck autoklaviert. Thermolabile oder geringe Mengen spezieller Substanzen wurden sterilfiltriert und dem Medium nach dem Abkühlen (ca. 50 °C) zugegeben. Für die Herstellung fester Medien erfolgte vor dem Autolavieren die Zugabe von 1,5 % Agar.

Die Herstellung anaerobe Medien erfolgte, indem die Flüssigkeit nach der Einstellung des pH-Werts abwechselnd mit N<sub>2</sub> be- und durch Anlegen eines Vakuums entgast wurde. Zeigte der zugegebene Redoxindikator (1 mg/ml) einen deutlichen Farbumschlag, wurde das Medium autoklaviert. Thermolabile und geringe Mengen spezieller Substanzen sowie Titan-NTA-Lösung (2.2.3) zur weiteren Reduktion wurden dem Medium nach dem Abkühlen (ca 50 °C) zugegeben.

#### 2.2.1.1 LB- (*Luria-Bertani*-) Medium (Sambrook et al., 2001)

Trypton	10	g	1	% (w/v)
NaCl	10	g	172	mM
Hefeextrakt	5	g	0,5	% (w/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

#### 2.2.1.2 Phosphatlimitiertes Minimalmedium, MES-gepuffert (Bertram et al., 1990)

Glucose x H <sub>2</sub> O	40	g	202	mM
MES	21,3	g	100	mM
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	2	g	15,1	mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	100	mg	400	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	mg	740	mM
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	15	mg	54	mM
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	15	mg	88	mM
NaCl	10	mg	170	mM
CaCl x 2 H <sub>2</sub> O	10	mg	68	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10	mg	41	mM
Thiamin-HCl	2	mg	5,9	µM
p-Aminobenzoesäure	2	mg	16	µM
Biotin	100	µg	0,4	µM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 6 M NaOH auf 7,3 eingestellt und betrug nach dem Autoklavieren ca. 6,9.

### 2.2.1.3 SOB-Medium (Sambrook et al., 2001)

Trypton	5	g	2	% (w/v)
Hefeextrakt	1,5	g	0,5	% (w/v)
NaCl	140	mg	10	mM
KCl	480	mg	2,5	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 125</b>	<b>ml</b>		

Vor Gebrauch wurden dem Medium 125 ml getrennt autoklavierte Magnesiumsalze zugegeben:

MgCl x 6 H <sub>2</sub> O	508	mg	10	mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	610	mg	10	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 125</b>	<b>ml</b>		

### 2.2.1.4 TB-Medium (Sambrook et al., 2001)

Trypton	12	g	1,2	% (w/v)
Hefeextrakt	24	g	830	M
Glycerin	4	ml	0,4	% (w/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 900</b>	<b>ml</b>		

Vor Gebrauch wurden dem Medium 100 ml getrennt autoklavierter Kaliumphosphatpuffer (0,1 M) zugegeben:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31	g	170	mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54	g	720	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		

### 2.2.1.5 2x YTG-Medium (Oultram et al., 1988; mod.)

Glucose x H <sub>2</sub> O	5	g	25	mM
Trypton	16	g	1,6	% (w/v)
Hefeextrakt	10	g	1	% (w/v)
NaCl	5	g	86	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

## **2.2.2 Nährmedien für *Saccharomyces cerevisiae***

### **2.2.2.1 SD- (*synthetic dropout*) Medium**

Für die Herstellung von 1000 ml SD-Minimalmedium wurden 6,7g *SD base* (Grundmedium ohne Aminosäuren) eingewogen, mit H<sub>2</sub>O auf 850 ml aufgefüllt und auf einen pH von 5,8 eingestellt. Im Falle von Platten wurden zusätzlich 20 g/l Agar eingewogen. Nach dem Autoklavieren wurden dem Grundmedium 50 ml Glucose-Lösung (40 %, w/v, Endkonzentration 2 %) und 100 ml der jeweiligen sterilen 10x DO- (*dropout*) Lösung (Aminosäure- und Nukleosidgemisch) zugegeben.

#### **10x DO- (*dropout*) Lösung**

Adeninhemisulfat	200	mg
L-Arginin-HCl	200	mg
L-Histidin-HCl x H <sub>2</sub> O	200	mg
L-Isoleucin	300	mg
L-Leucin	1000	mg
L-Lysin-HCl	300	mg
L-Methionin	200	mg
L-Phenylalanin	500	mg
L-Threonin	200	mg
L-Tryptophan	200	mg
L-Tyrosin	300	mg
Uracil	200	mg
L-Valin	1500	mg
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>

### **2.2.2.2 YPD-Medium**

Pepton	20	g
Hefeextrakt	10	g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 50 ml Glucose-Lösung (40 %, w/v, Endkonzentration 2 %) zugegeben. Im Falle der Herstellung von Platten wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich 20 g/l Agar eingewogen.

### 2.2.3 Medienzusätze

Die in **Tab. 12** aufgeführten Medienzusätze wurden als 1000fach konzentrierte Stammlösungen in ihrem jeweiligen Lösungsmittel angesetzt. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und den sterilen, abgekühlten (ca. 50 °C) Medien zugesetzt. Ihre Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20 °C.

Tab. 12 Medienzusätze

Medienzusätze	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]
Ampicillin, Na-Salz	100 (H <sub>2</sub> O)	100
Chloramphenicol	30 (Ethanol, 96 %, v/v)	30
Clarithromycin <sup>1)</sup>	5 (H <sub>2</sub> O)	5
Erythromycin	25 (Ethanol, 50 %, v/v)	250
IPTG	24 (H <sub>2</sub> O)	12-48
Kanamycin	50 (H <sub>2</sub> O)	50
Rifampicin	200 (Ethanol, 50 %, v/v)	150
Tetracyclin-Hydrochlorid	20 (H <sub>2</sub> O)	20
Thiamphenicol	20 (Ethanol, 50 %, v/v)	20

Ein für anaerobe Medien verwendeter Zusatz ist Titan(III)-NTA (Nitrilotrichloressigsäure) -Lösung. Titan-NTA ist ein sehr effektives Reduktionsmittel. Auf Grund seines stark negativen Redoxpotentials ( $E^0 [\text{Ti}^{3+}/\text{Ti}^{4+}] = -480 \text{ mV}$ ) bietet es die Möglichkeit, Medien und Lösungen direkt vor der Benutzung zu reduzieren. Zur Herstellung von 75 ml dieser Lösung wurden in einer Müller & Krempel-Flasche (125 ml, Bülach, Schweiz) 5,73 g NTA (400 mM) in 30 ml H<sub>2</sub>O und 20 ml 5 M Natronlauge gelöst und anaerobisiert. Anschließend erfolgte unter ständigem Rühren die Zugabe von 6,4 ml 15 %iger (w/v) TiCl<sub>3</sub>-Lösung und 10 ml anaerober NaCO<sub>3</sub>-Lösung (2 M). Eine zusätzliche Kanüle sorgte für den, durch die CO<sub>2</sub>-Entwicklung notwendigen, Druckausgleich. Die fertige Lösung (dunkelblau bis türkisfarben) wurde mit anaerobisiertem Wasser auf 75 ml aufgefüllt und abschließend sterilfiltriert.

Für die Selektion ausgewählter rekombinanter *S. cerevisiae*-Stämme war es notwendig, dem SD-Medium (2.2.2.1) zusätzlich 3-AT (3-Amino-1, 2, 4-triazol) zuzusetzen. Dazu wurde eine 1 M 3-AT-Stammlösung hergestellt, sterilfiltriert und dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen (ca. 50 °C) in entsprechender Konzentration zugesetzt.

### **2.2.4 Stammhaltung**

Zur Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen wurden 0,7 ml Zellsuspension einer ÜN in LB-Medium, gegebenenfalls unter selektiven Bedingungen, gewachsenen Kultur mit Glycerin (30 %, v/v) versetzt und in 2-ml-Schraubdeckelreaktionsgefäßen bei -70 °C gelagert. Alternativ wurde anstatt Glycerin DMSO (10 %, v/v) verwendet. Glycerin und DMSO werden bei der Stammhaltung als Gefrierschutzmittel eingesetzt, da sie als stark polare Moleküle Wasser binden und somit die Makromoleküle stabilisieren. In den Zellen wird dadurch ein Wasserentzug, eine Konzentrierung von Elektrolyten und eine Bildung von Eiskristallen verhindert.

Die Stammhaltung von *S. cerevisiae* erfolgte analog der von *E. coli*, jedoch erfolgte hier die Anzucht in YPD-Medium.

Für die Herstellung von Stammkulturen von *C. acetobutylicum* wurde die Sporenbildung des Organismus ausgenutzt. 200 µl einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden unter anaeroben Bedingungen auf 2x YTG-Platten, gegebenenfalls unter Antibiotikaselektion, ausplattiert und ca. eine Woche bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien mit ca. 5 ml 2x YTG-Medium unter Zuhilfenahme eines Drigalskispatels von den Platten abgeschwemmt, in 2-ml-Schraubdeckelreaktionsgefäße abgefüllt (Sporensuspension) und aerob bei -70 °C gelagert.

Alternativ erfolgte die Herstellung einer Sporensuspension, indem 50 ml einer sporulierenden *C. acetobutylicum*-Kultur zentrifugiert (5000 Upm, 10 min, 4 °C) und das Sediment in 1-5 ml Puffer (PBS- oder Kalium- oder Natriumphosphatpuffer) gelöst wurden. Die Lagerung erfolgte ebenfalls in Schraubdeckelreaktionsgefäßen bei -70 °C.

Die Reinheit einer Kultur wurde durch mikroskopische Betrachtung kontrolliert. Im Falle von *C. acetobutylicum* wurde die Identität zusätzlich durch eine gaschromatographische Bestimmung des Produktspektrums (2.2.6.2) verifiziert.

### **2.2.5 Anzuchtbedingungen**

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob auf LB-Fest- und in LB-Flüssigmedium. Flüssige Medien wurden bei 37 °C und 150-200 Upm und Agarplatten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bei Kulturvolumina bis 5 ml wurde mit Reagenzgläsern, bei größeren Volumina mit Schikanen-Erlenmeyerkolben, gearbeitet.

Im Falle von *S. cerevisiae* wurde analog zu *E. coli* gearbeitet. Lediglich das Medium (SP- und/oder YPD-Medium) und die Schüttlergeschwindigkeit (200-250 Upm) wurden angepaßt.

Die Kultivierung von *C. acetobutylicum* erfolgte anaerob und je nach Anwendung in 2x YTG- oder MES-gepuffertem Medium. Kulturvolumina bis 5 ml wurden in 10-ml-Hungate-Röhrchen (Bellco Glass, Inc.; Vineland, USA; in Deutschland verkauft

von Dunn Labortechnik; Asbach) mit Butylstopfen und Schraubdeckeln, größere Volumina in 125-, 500- und 1000-ml-Müller & Krempel-Flaschen (Bülach, Schweiz) mit Naturgummistopfen und Edelstahldeckeln inkubiert. Um eine Zerstörung der Kulturgefäße durch produzierte Gase wie Kohlendioxid und Wasserstoff zu vermeiden, wurden diese höchstens bis zur Hälfte mit Medium befüllt.

## **2.2.6 Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern**

### **2.2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte**

Die optische Dichte von Bakterien und Hefekulturen wurde in 1,6-ml-Einmal-küvetten aus Plastik mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gegen das entsprechende sterile Medium als Leerwert bestimmt. Bei Proben von Zelldichten größer 0,3 wurde mit sterilem Medium verdünnt, um im linearen Meßbereich des Geräts zu bleiben.

### **2.2.6.2 Gaschromatographische Analytik von Produkten**

Die Quantifizierung der von *C. acetobutylicum* produzierten Säuren und Lösungsmittel erfolgte in einem Chrompack CP9001-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor. Zur Probenvorbereitung wurden 1,5 ml einer Kultur zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, 4°C), 1 ml des Überstands in ein 1-ml-Rollrandgefäß (Chrompack GmbH; Frankfurt) überführt, mit 100 µl internem Standard (110 mM Isobutanol in 2 M Schwefelsäure) versetzt und mit einem Septum gasdicht verschlossen. Der Probenauftrag erfolgte per Hand unter Verwendung einer Hamilton-Spritze (Hamilton Bonaduz AG; Bonaduz, Schweiz). Zur Analyse wurden folgende Chromatographiebedingungen gewählt:

Detektor	FID (Micro-TCD)
Detektortemperatur	230 °C
Injektortemperatur	210 °C
Probenvolumen	1 µl
Säule	Glas (Innendurchmesser 2 mm)
Säulenlänge	2 m
Säulenpackung	Chromosorb 101 (80-100 mesh)
Trärgas	N <sub>2</sub> (30 ml/min)
Temperaturprofil	155 °C bis 197 °C mit 9K/min, 197 °C bis 6,65 min

Die verwendete Säule erlaubt sowohl Wechselwirkungen mit Alkoholen, als auch mit Carbonsäuren, so daß alle Hauptstoffwechselprodukte von *C. acetobutylicum* in einer gemeinsamen Analyse aufgetrennt werden konnten.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte unter Verwendung der Computersoftware Maestro Sampler II, Version 2.1 (Varian Deutschland GmbH; Darmstadt) anhand eines Kalibrierchromatogramms, das mit Hilfe einer Kalibrierlösung erstellt wurde. Die Kalibrierlösung enthielt die zu analysierenden Substanzen Acetat, Aceton, Butyrat, Butanol und Ethanol jeweils in einer Konzentration von 5 mM und 10 mM des internen Standards Isobutanol.

## **2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

### **2.3.1 Behandlung von Geräten und Lösungen**

Alle Geräte und Lösungen mußten vor der Verwendung derart behandelt werden, daß eventuell vorhandene Nukleasen inaktiviert wurden. Dazu wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen vor Gebrauch für min. 15 min bei 121 °C autoklaviert, Kleingeräte aus Metall und Gegenstände wie Drigalskispatel und Impföse wurden entweder mit Ethanol (70 %, v/v) gespült oder kurz mit Ethanol abgeflammt. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

Die für das Arbeiten mit RNA benötigten Geräte und Reagenzien wurden, wenn möglich, doppelt autoklaviert und separat aufbewahrt. Im Falle, daß diese Behandlung nicht möglich war, wurden Geräte und Arbeitsflächen mit 0,1 % SDS und 0,1 M NaOH behandelt und anschließend mit doppelt autoklaviertem Wasser gespült. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert und ebenfalls separat gelagert. Alle Arbeiten erfolgten mit Einmal-Handschuhen.

### **2.3.2 Wasser, Puffer und Lösungen**

Folgende im Text nicht weiter erläuterte Lösungen und Puffer wurden in den verschiedenen Versuchen verwendet:

#### **Wasser**

Mit H<sub>2</sub>O wird in der Regel das aus einem Ionenaustauscher Elgastat Maxima gewonnene bidestillierte Wasser bezeichnet. Für die Herstellung komplexer Medien und Laufpuffer für Gele wurde jedoch lediglich demineralisiertes Wasser verwendet.

**TAE-Puffer (50x)**

Tris	242	g	2	M
EDTA	37,2	g	100	mM
Eisessig	57,1	ml	1	M
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		<b>pH 7,5</b>

**TBE-Puffer (5x)**

Tris	121	g	1	M
EDTA	3,7	g	10	mM
Borsäure	53,4	g	0,83	M
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		<b>pH 8,3</b>

**TE-Puffer (1x)**

Tris/HCl (1 M, pH 8)	10	ml	10	mM
EDTA (0,5 M)	2	ml	1	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

**Lysozym-Lösung**

Lysozym 20 mg/ml H<sub>2</sub>O

Die Lösung konnte aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden. Am Verwendungstag wurde die entsprechende Menge aufgetaut und nur an diesem Tag verwendet.

**Proteinase K-Lösung**

Proteinase K 2,5 mg/ml TE-Puffer

Die Lösung konnte aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden. Am Verwendungstag wurde die entsprechende Menge aufgetaut und nur an diesem Tag verwendet.

**RNase A-Lösung**

RNase A 10 mg/ml TE-Puffer  
NaCl 15 mM

Die Lösung wurde vor Gebrauch zur Inaktivierung von DNasen für 15 min bei 95 °C inkubiert, nach dem Abkühlen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

## 2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.4.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *C. acetobutylicum* (Bertram und Dürre, 1989; mod.)

Die Isolierung von Gesamt-DNA erfolgte im Falle von *C. acetobutylicum* aus Kulturvolumina von 50-75 ml 2x YTG-Medium (2.2.1.5). Die Zellen wurden über Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4 °C) sedimentiert, das Sediment mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und in 1,9 ml STE-Puffer suspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 380 µl Lysozym-Lösung (20 mg/ml) und eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurden nacheinander 240 µl EDTA- (0,5 M) und 20 µl Tris- (1 M) Lösung zugegeben, gemischt und weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100 µl Proteinase K-Lösung (2,5 mg/ml) und eine Proteolyse für 3 h bei 37 °C unter langsamem Schwenken. Nach der Zugabe von 600 µl Na-Perchlorat-Lösung (5 M) und gutem Mischen wurde der Ansatz einer Phenol-Isoamylalkohol-Extraktion (2.5.1) unterzogen. Die DNA wurde anschließend durch die Zugabe von 2,7 ml Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation (13000 Upm, 30 min, 4 °C) sedimentiert und bei 37 °C getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und mit RNase A-Lösung versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden 60 µl Proteinase K-Lösung zugegeben, 2h bei 37 °C inkubiert und der Ansatz abermals einer Phenol-Isoamylalkohol-Extraktion (2.5.1) unterzogen. Nach einer abschließenden Ethanolfällung wurde die DNA mit Hilfe einer gebogenen Glaspipette geangelt, mit 70 %iger Ethanol-Lösung gewaschen und in 300 µl TE-Puffer aufgenommen.

#### **STE-Puffer**

Saccharose	67	g	6,7	% (w/v)
Tris	6,06	g	50	mM
EDTA	0,37	g	1	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		<b>pH 8,0</b>

### 2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum*

Um der geringen biologischen Halbwertszeit von RNA Rechnung zu tragen, fand die Probenahme im 2-ml-Maßstab möglichst rasch statt, und die Zellen wurden nach Zentrifugation (14000 Upm, 4 °C, 1 min) sofort in 2-ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### 2.4.2.1 Isolierung von Gesam-RNA (Oelmüller et al., 1990; mod.)

Um große Mengen Gesamt-RNA zu extrahieren, wurden das Zellsediment in 0,7 ml eiskaltem ASE-Puffer suspendiert und sofort 0,7 ml auf 60 °C erwärmtes 'AquaPhenol<sup>TM</sup>' (wassergesättigtes Phenol) zugegeben und 30 s kräftig gemischt. Der Ansatz wurde anschließend 10 min bei 60 °C inkubiert und die beiden Phasen durch wiederholtes Mischen in Suspension gehalten. Nach einer Zentrifugation (13000 Upm, 10 min, 4 °C) wurde die wäßrige Phase in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 0,6 ml 'AquaPhenol<sup>TM</sup>' versetzt. Nach dem Mischen wurde erneut zentrifugiert und die Phenol-Behandlung so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Abschließend erfolgte jeweils eine Extraktion mit 'AquaPhenol<sup>TM</sup>/ReadyRead<sup>TM</sup>' (1:1, v/v) bzw. 'Ready/Red<sup>TM</sup>'. Nach Beendigung der Behandlung wurde die RNA einer Ethanolfällung (2.5.2) unterzogen, das Sediment in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

Auf diese Weise präparierte RNA wies in den meisten Fällen noch eine Verunreinigung mit DNA auf, so daß eine DNase-Behandlung angeschlossen wurde. Hierzu wurde das Volumen der RNA-Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 150 µl erhöht und 20 µl DNase-Puffer (10x) und 30 µl RNase-freie DNaseI (100 U) zugegeben. Nach mind. 30 min Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz zur Entfernung der DNase einer Phenol-Chloroform-Extraktion (2.5.1, mit den Lösungen siehe oben) und einer Ethanolfällung (2.5.2) unterzogen und die RNA abschließend in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Sollte die RNA für den Einsatz in einer RT-PCR (2.8.3) verwendet werden, so wurde die DNase-verdaute RNA mit 7,5 µl EDTA-Lösung (25 mM) für 10 min bei 65 °C inkubiert.

#### **ASE-Puffer**

Na-Acetat	164	mg	20	mM
SDS	0,5	g	0,5	% (w/v)
EDTA	37	mg	1	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		<b>pH 5,5</b>

#### 2.4.2.2 Isolierung von RNA mit dem 'RNeasy Mini Kit'

Wurden nur geringe Mengen Gesamt-RNA benötigt, so erfolgte die Präparation mit dem 'RNeasy Mini Kit' nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Um der dicken Mureinschicht Gram-positiver Organismen Rechnung zu tragen, wurden die Zellen vorbehandelt. Eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C in Lysozymlösung (20 mg/ml) half, die Zellen zu lysieren. Bei Verunreinigung der RNA mit DNA wurde wie unter 2.4.2.1 beschrieben verfahren.

### **2.4.3 Isolierung von Plasmid DNA**

#### **2.4.3.1 Mini-Präparation aus *E. coli* mit dem 'GFX™ Micro Plasmid Prep Kit'**

Zur Gewinnung von reiner Plasmid-DNA wurde der 'GFX™ Micro Plasmid Prep Kit' nach den Abgaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieser Anwendung beruht auf einer, durch chaotrope Salze hervorgerufenen Bindung der DNA an eine Glasfasermatrix, von der die DNA anschließend durch H<sub>2</sub>O oder Puffer eluiert werden kann.

Wurde weniger reine DNA benötigt bzw. sollten nur Plasmide aus potentiellen Klonen einer Ligation präpariert werden, so wurden gebrauchte Säulen des 'GFX™ Micro Plasmid Prep Kits' 3mal mit 100 µl H<sub>2</sub>O gespült und anschließend wie beschrieben verwendet. Eine Wiederverwendung der Säulen war bis zu 3mal möglich.

#### **2.4.3.2 Midi-Präparation aus *E. coli* (Sambrook et al., 2001)**

Große Mengen sauberer Plasmid DNA aus *E. coli* wurden aus 50-70 ml einer auf LB-Medium, ÜN bei 37 °C gewachsenen Kultur isoliert. Das durch Zentrifugation (4000 Upm, 10 min, 4 °C) erhaltene Zellsediment wurde in 5 ml Lösung A suspendiert und nacheinander 10 ml frische Lösung B und 7,5 ml Lösung C zugegeben, wobei nach jedem Schritt durch vorsichtiges Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation (4000 Upm, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand durch 2 Lagen Mullbinden gefiltert, die darin enthaltene Plasmid-DNA durch die Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (4000 Upm, 20 min, 4 °C) sedimentiert. Das DNA-haltige Sediment wurde in 2 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Zur selektiven und quantitativen Abtrennung der noch zu großen Teilen enthaltenen RNA wurden der wässrigen DNA-Lösung 2 ml LiCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (4000 Upm, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-fällung (2.5.2) unterzogen. Die präzipitierte DNA wurde zentrifugiert (14000 Upm, 30 min, 4 °C), mit Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und in 400 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Entfernung von RNA-Resten wurde der Ansatz 30 min mit RNase A (10 mg/ml) bei 37 °C inkubiert. Eine abschließende Reinigung und Konzentrierung der Plasmid-DNA erfolgte über Phenol-Chloroform-Extraktion (2.5.1) und Ethanol-fällung (2.5.2). Die saubere DNA wurde in 100-200 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

**Lösung A**

Tris	3	g	25	mM
Glucose	9	g	50	mM
EDTA	3,7	g	10	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

**Lösung B (frisch)**

SDS (10 %, w/v)	10	ml	1	%
NaOH (2 M)	10	ml	200	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		

**Lösung C**

K-Acetat	29,4	g	5	M
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		<b>pH 5,2</b>

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure eingestellt.

**LiCl<sub>2</sub>-Lösung**

LiCl <sub>2</sub>	21,2	g	5	M
Tris	0,6	g	50	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		

#### 2.4.3.3 Mini-Präparation aus *C. acetobutylicum* mit dem 'GFX™ Micro Plasmid Prep-Kit'

Die Präparation von Plasmiden aus *C. acetobutylicum* erfolgte analog der Präparation aus *E. coli* mit dem 'GFX™ Micro Plasmid Prep Kit' nach den Angaben des Herstellers.

#### 2.4.3.4 Schnellnachweis von Plasmiden in *E. coli* (*cracking*)

Sollten viele *E. coli*-Klone nach einer Transformation auf ein potentiell vorhandenes DNA-Fragment getestet werden, so wurde die Methode des sog. *cracking* angewendet. Voraussetzung für die Anwendung ist, daß die Transformation mit einem Plasmid stattfand, das in hoher Kopienzahl in der Zelle vertreten ist.

Die Einzelkolonien oder ein Teil eines Zellsediments wurden in 50 µl EDTA-Lösung (10 mM, pH 8,0) suspendiert, mit 50 µl frisch angesetztem *cracking*-Puffer

versetzt und gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 70 °C und dem anschließenden Abkühlen auf Eis wurde die Probe mit 5 µl Kaliumchlorid-Lösung (4 M mit 0,4 %, w/v, Bromphenolblau) versetzt und erneut gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, 4 °C) zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden 15 µl des Überstands abgenommen und direkt in einem Agarosegel (2.6.1) analysiert.

#### ***cracking*-Puffer**

NaOH (2 M)	100	µl	0,2	N
SDS (10 %)	50	µl	0,5	% (w/v)
Saccharose	0,2	g	20	% (w/v)
H <sub>2</sub> O	ad 1	ml		

#### **2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden in ausreichender Menge mit dem 'NucleoSpin Extract Kit' entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

## **2.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren**

### **2.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Um DNA-Lösungen von Proteinverunreinigungen zu befreien, wurde die DNA-Lösung mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25: 24: 1, v/v/v), versetzt, 30 s gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, RT). Die obere wäßrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Prozedur so oft wiederholt, bis nach Zentrifugation keine Proteininterphase mehr zu erkennen war. Daraufhin erfolgten, zur Entfernung eventuell vorhandener Phenolreste, in einem neuen Reaktionsgefäß die Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohl (24: 1, v/v) zur oberen Phase, 30 s Mischen und eine erneute Zentrifugation. Die obere, DNA-haltige Phase wurde schließlich ethanol- (2.5.2) oder isopropanolgefällt (2.5.3).

### **2.5.2 Ethanolfällung**

Der DNA-Lösung wurden 3 M Natriumacetat (10 %, v/v, pH 5,2) zugegeben, gemischt und die DNA mit 2,5 Vol. Ethanol (96 %, v/v) gefällt. Nach einer Inkubation von mind. 20 min bei -20 °C wurde die präzipitierte DNA zentrifugiert

(14000 Upm, 30 min, 4 °C), mit Ethanol (70 %, v/v) gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.5.3 Isopropanolfällung**

Der DNA-Lösung wurden 0,7 Vol. Isopropanol zugegeben und die gefällte DNA sofort durch Zentrifugation (14000 Upm, 30 min, 4 °C) sedimentiert. Da Isopropanol in stärkerem Maße als Ethanol zur Kopräzipitation von Salzen führt, erfolgte hier keine Zugabe von Natriumacetat. Die DNA wurde mit Ethanol (70 %, v/v) gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.5.4 Dialyse von DNA**

Ligationsansätze wurden z. T. durch Mikrodialyse entsalzt, um größere Volumina in eine Elektroporation einsetzen zu können. Zu diesem Zweck wurde ein steriler Membranfilter auf in eine Petrischale gefülltes, steriles Wasser aufgelegt und der Ligationsansatz vorsichtig auf den Filter pipettiert. Nach 30 min war die Dialyse abgeschlossen und der Ligationsansatz wurde vorsichtig abgenommen.

### **2.5.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA mittels Mikrokonzentratoren**

Um Plasmid-Lösungen oder PCR-Ansätze von Salzen, Nukleotiden, Oligonukleotiden und Proteinen < 100 kDa bzw. < 30 kDa zu reinigen und zu konzentrieren, wurden 'Microcon<sup>®</sup> YM-100'-Mikrokonzentratoren bzw. 'Microcon<sup>®</sup> YM-30'-Mikrokonzentratoren verwendet. Die DNA-haltige Lösung wurde mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt, auf die Konzentratormembran pipettiert und bei RT und 2000-4000 Upm so lange zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Der Vorgang wurde bis zu 3mal wiederholt. Das gereinigte und konzentrierte Produkt wurde erhalten, indem der Mikrokonzentrator umgekehrt in ein neues Reaktionsgefäß eingesetzt und kurz zentrifugiert (13000 Upm, RT) wurde.

### **2.5.6 Reinigung von DNA mit dem 'NucleoSpin Extract Kit'**

PCR-Ansätze mit Fragmentgrößen >120 Bp sowie restriktionsverdaute Plasmide wurden mit dem mit dem 'NucleoSpin Extract Kit' entsprechend den Herstellerangaben von Salzen, Nukleotiden, Oligonukleotiden und Proteinen gereinigt.

### **2.5.7 Reinigung von DNA mit dem 'QIAquick PCR purification Kit'**

PCR-Ansätze mit Fragmentgrößen >120 Bp wurden mit dem mit dem 'QIAquick PCR purification Kit' entsprechend den Herstellerangaben von Salzen, Nucleotiden, Oligonucleotiden und Proteinen gereinigt.

### **2.5.8 Reinigung radioaktiv markierter DNA mit 'MicroSpin™ G-25 Columns'**

Die Abtrennung nicht eingebauter Radiaktivität erfolgte durch Gelfiltration. 'MicroSpin™ G-25 Columns' wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.5.9 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen**

Die Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte photometrisch über die Ermittlung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Verwendung von Quarzglas-Küvetten. Eine Absorption von 1 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg einzelsträngiger RNA pro ml (Sambrook et al., 2001). Zur Reinheitskontrolle wurde zusätzlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm und der Quotient aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  ermittelt. Protein- und phenolfreie Lösungen weisen einen Quotienten von 1,8-2,0 auf. Ein höherer Wert deutet auf eine entsprechende Verunreinigung hin.

## **2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

### **2.6.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese**

Die nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von sowohl DNA als auch RNA erfolgte in horizontalen Gelkammern eigener Bauart in einem TAE-Puffersystem. Je nach Größe der aufzutrennenden Moleküle wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 % (w/v) bzw. 2 % (w/v) verwendet. Zur Beschwerung und Markierung der Lauffront wurde die jeweilige DNA- bzw. RNA-Probe mit 0,2 Vol. Ladepuffer (MBI Fermentas; St. Leon-Rot) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm, bis die Lauffront ca. 1 cm vor Ende des Gels angekommen war. Das gesamte Gel wurde anschließend für ca. 10 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml TAE) inkubiert. Mit Hilfe von UV-Licht und einer Videodokumentationsanlage konnte DNA bzw. RNA auf Grund der Fluoreszenz des zwischen die Basen der Nucleinsäure interkalierten Ethidiumbromids visualisiert und dokumentiert werden.

### **2.6.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese**

Da das Laufverhalten von einzelsträngigen RNA-Molekülen bei Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen entscheidend von der Sekundärstruktur beeinflusst wird, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von RNA für Hybridisierungszwecke in formaldehydhaltigen denaturierenden Agarosegelen. Um ein 1 %iges Gel der Dimension 250 x 200 x 5 mm zu gießen, wurden 1,5 g Agarose in 108 ml Wasser autoklaviert. Nach Zugabe von 27 ml Formaldehyd (37 %, v/v) und 15 ml 10 x MAE-Puffer wurde das Gel sofort gegossen und bei 4 °C zur Aushärtung für mind. 2 h gelagert. Die Probenvorbereitung erfolgte, indem 5-10 µg Gesamt-RNA mit 0,2 Vol. Formamid-Auftragspuffer (5x) versetzt und 15 min bei 55 °C inkubiert wurden, um eine vollständige Denaturierung der Proben zu erreichen. Nachdem das erstarrte Gel mit kaltem MAE-Puffer geflutet worden war, wurden die Proben aufgetragen und die Elektrophorese für ca. 3 h bei einer Feldstärke von 4 V/cm im Kühlraum durchgeführt. Nach Abschluß des Gellaufs wurde das Gel zusammen mit einem Lineal zur Dokumentation der Laufstrecke photographiert. Aus der Laufstrecke und der bekannten Größe der im Längenstandard enthaltenen DNA-Fragmente konnte auf diese Weise die Größe der, nach Hybridisierung mit entsprechender Sonde, im Autoradiogramm erhaltenen Signale bestimmt werden. Nach Beendigung des Gellaufs konnte der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (2.10) durchgeführt werden.

#### **MAE-Puffer (10x)**

MOPS	41,8	g	200	mM
Na-Acetat	4,1	g	50	mM
EDTA	1,86	g	5	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		<b>pH 7,0</b>

#### **Formamid-Auftragspuffer (5x)**

Bromphenolblau	0,5	g	0,5	% (w/v)
Na-EDTA (1 M)	400	µl	4	mM
Formamid (deionisiert)	3,8	ml	3,8	% (v/v)
EtBr-Lösung (10 mg/ml)	1	ml	2,5	mM
Laufpuffer (10x)	40	ml	40	% (v/v)
Formaldehyd (37 %,v/v)	7,2	ml	9	mM
Glycerin	20	ml	20	% (v/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		

### **2.6.3 Größenbestimmung und Abschätzung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Zur Größenbestimmung und Abschätzung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden die Größenstandards 'Gene Ruler™ DNA Ladder Mix' sowie die 'RNA Ladder, High Range, ready-to-use' (beide MBI Fermentas; St. Leon-Rot) verwendet.

## **2.7 Enzymatische Modifikation von DNA**

### **2.7.1 Restriktionsspaltung von DNA**

Der Restriktionsverdau von Plasmid- bzw. chromosomaler DNA erfolgte entsprechend den Empfehlungen der Hersteller der verwendeten Restriktionsenzyme in 20-100- $\mu$ l-Ansätzen. Die Restriktionsspaltungen konnten durch die Zugabe von Auftragspuffer, Hitzeinaktivierung, Phenol-Chloroform-Behandlung (2.5.1) oder Aufreinigung mit dem 'NucleoSpin Extract Kit' (2.5.6) gestoppt werden. Bei Mehrfachrestriktion wurde ein Puffersystem verwendet, in dem alle benötigten Enzyme 50-100 % Aktivität aufwiesen. Waren die Pufferbedingungen nicht in Einklang zu bringen, so wurden der Ansatz zwischen den einzelnen Restriktionsspaltungen durch eine Mikrodialyse (2.5.4), eine Reinigung über Mikrokonzentratoren (2.5.5) oder eine Ethanol-fällung (2.5.2) umgepuffert. Lagen die Restriktionsschnittstellen an den Enden von DNA-Fragmenten, so erfolgte die Restriktion bei RT ÜN, um einem temperaturbedingten 'Flattern' der Enden, und einer dadurch bedingten eingeschränkten DNA-Spaltung entgegen zu wirken. Lagen die Schnittstellen zweier Enzyme sehr nah beieinander (1-10 Bp), so sollten im Falle einer Doppelrestriktion die Angaben des Herstellers zu Reihenfolge, Puffersystem und Temperatur beachtet werden.

Um partiell verdaute chromosomale DNA zur Anwendung im Hefe-Ein-Hybrid-System zu präparieren, wurde in einem Vorversuch bestimmt, wie lange bei einer definierten Menge DNA verdaut werden muß, um Fragmentgrößen zw. 800-2500 Bp zu erhalten.

### **2.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (Sambrook et al., 2001)**

Um unerwünschte Ligationen von DNA-Fragmenten zu unterbinden bzw. den Phosphatrest eines DNA-Fragments auszutauschen, erfolgte eine Dephosphorylierung, d. h. eine Abspaltung des 5'-Phosphats des DNA-Fragments unter Anwendung der *shrimp alkaline phosphatase* (SAP). Diese zeichnet sich gegenüber der *calf intestinale phosphatase* (CIP) und der *bacterial alkaline phosphatase* durch Hitzeinaktivierbarkeit und, in bezug auf pH und Salzkonzen-

tration, relativ breite Optima der Reaktion aus. Nach Reinigung (2.5.5, 2.5.6) des Restriktionsansatzes erfolgte die Dephosphorylierungsreaktion in Ansätzen von 20-100 µl in geeignetem Puffer und einer Enzymkonzentration von 2 U/µl. Nach einer Inkubation von 20-60 min bei 37 °C, je nach Menge der eingesetzten DNA, erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch eine Inkubation des Ansatzes bei 65 °C für 20 min. Die dephosphorylierte DNA konnte sofort weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

### **2.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in Ansätzen von 20 µl. Die dephosphorylierte geschnittene Plasmid-DNA und das entsprechend geschnittene DNA-Fragment wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:5 gemischt, mit 2 µl 10x T4-Ligasepuffer, gelagert als 50-µl-Aliquots bei -20 °C, versetzt und mit Wasser auf 19 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) gestartet und erfolgte bei 16 °C für mind. 6 h oder ÜN.

### **2.7.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit [<sup>32</sup>γ]ATP. Hierfür wurde in einem 20-µl-Ansatz die zu markierende dephosphorylierte (2.7.2) DNA (1-20 pmol) mit 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) in entsprechendem Puffer und 1 µl [<sup>32</sup>γ]ATP (10 µCi) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 1 µl EDTA (0,5 M, pH 8) wurde die Reaktion gestoppt. Die markierte Sonde konnte bei 4 bzw. -20 °C gelagert werden. Nicht eingebaute Radioaktivität wurde durch Reinigung (2.5.8) entfernt.

## **2.8 PCR-Techniken**

### **2.8.1 Standard-PCR**

Die Standard-PCR (*polymerase chain reaction*, Saiki et al., 1985) ist eine effiziente Methode zur schnellen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Sie wurde zur Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen, Gelretardationsexperimente und *Northern blot*-Experimente sowie für den analytischen Plasmidnachweis eingesetzt. Für alle Anwendungen wurde eine im Rahmen eines Studentenpraktikums isolierte *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Trotz der größeren Fehlerate ( $1 \times 10^{-4}$ ) der *Taq*-DNA-Polymerase gegenüber anderen Polymerasen (z. B.  $1 \times 10^{-5}$ , 'Deep Vent<sup>®</sup>') wurde sie bevorzugt, da sie den Vorteil bot, im Falle jeder Anwendung und nahezu unabhängig von der Temperatur ein Amplifikations-

produkt zu liefern. Zur Spezifikation der Amplifikation des Zielfragments wurden lediglich die Anlagerungstemperatur und die Magnesiumkonzentration variiert, sowie in besonders schwierigen Fällen DMSO und Tween in geeigneten Konzentrationen zugesetzt. Weitere für die Reaktion notwendige Zusätze wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. PCR-Ansätze wurden in der Regel in Volumina von 50 µl in 0,2- oder 0,5-µl-Reaktionsgefäßen angesetzt. Als Matrize wurden 10-50 ng Plasmid- bzw. 0,5-1 µg chromosomale DNA verwendet. Ein standardmäßiger Reaktionsansatz sowie ein standardmäßiger Reaktionszyklus ist im Folgenden aufgeführt.

Matrize	1 µl			
<i>Primer</i> 1 (10 pmol)	4 µl	initiale Denaturierung	5 min	95 °C
<i>Primer</i> 2 (10 pmol)	4 µl	Denaturierung	30 s	95 °C
Reaktionspuffer (10x)	5 µl	Hybridisierung	45 s	variabel
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	2 µl	Elongation	0,5 – 1 min/1000nt	72 °C
dNTP-Gemisch (10 mM)	1 µl	zurück zu Schritt 2, 32x		
DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl	finale Elongation	5 min	72 °C
H <sub>2</sub> O	32 µl			

Die Sequenz der *Primer* wurde so gewählt, daß der GC-Gehalt bei ca. 50 % lag und das 3'-Ende mit einem G oder C abschloß. Weiterhin wurde darauf geachtet, daß nicht mehr als vier gleiche Basen in Folge auftraten, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern, die die Amplifikation stören könnten. Die Anlagerungstemperatur wurde stets 3-5 °C unter der von Hersteller angegebenen Temperatur gewählt.

In einigen Fällen wurden 'Ready To Go<sup>TM</sup> PCR-Beads' nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hier liegt die *Taq*-DNA-Polymerase zusammen mit dem entsprechenden Puffer und den dNTPs lyophilisiert in kugelförmiger Form vor. Für eine Reaktion wurden lediglich 25 µl H<sub>2</sub>O, *Primer* und Matrize zugegeben.

### **2.8.2 PCR-vermitteltes Einfügen von Restriktionsschnittstellen**

Um DNA-Fragmente mit Schnittstellen zu versehen, wurden spezielle *Primer* konstruiert. Die 3'-Enden dieser *Primer* waren komplementär zur eingesetzten Matrize, der 5'-Bereich der *Primer* enthielt jedoch nicht komplementäre Basen. Auf diese Weise ließen sich Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in die Amplifikate einbauen, wodurch Klonierungen erleichtert wurden. Die Reaktion erfolgte analog der Standard-PCR (2.8.1), wobei in den meisten Fällen, auf Grund der Fehlpaarungen im 5'-Bereich, die Anlagerungstemperatur 5-7 °C

niedriger als die berechnete Temperatur gewählt wurde. Auf diese Weise erhaltene Fragmente ließen sich meist nur schneiden, wenn in 5'-Richtung der *Primer* noch zusätzliche (>2) Nukleotide angefügt wurden. Hierbei konnte es sich zum einen um eine vom Hersteller des entsprechenden Enzyms vorgegebene Sequenz handeln oder aber es wurden die entsprechenden komplementären Nukleotide der Matrize angehängt.

### **2.8.3 RT-PCR**

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umzuschreiben und diese in einem zweiten Schritt, der einer Standard-PCR entspricht, zu einem spezifischen Produkt zu amplifizieren. Ein Amplifikat wurde demnach nur erhalten, wenn die entsprechende mRNA eines Gens oder eines Operons im Zuge der Transkription gebildet worden war. Für RT-PCR-Ansätze wurden 'Ready To Go™ RT-PCR Beads' eingesetzt, die nach den Angaben des Herstellers gehandhabt wurden. Diese bieten den Vorteil, daß sowohl die Reverse Transkriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transcriptase*), die DNA-Polymerase (*Taq-DNA-Polymerase*) sowie die nötigen Pufferbestandteile in einem Reaktionsgefäß als dehydrierte Kügelchen vorliegen. Für einen Ansatz wurden die Kügelchen in 48 µl H<sub>2</sub>O gelöst, 0,05 µg Gesamt-RNA und 0,5 µl jedes Oligonukleotids (50 pmol) zugesetzt und folgendes Programm durchlaufen:

cDNA-Synthese	20 min	42 °C
Denaturierung	30 s	95 °C
Hybridisierung	45 s	variabel
Elongation	45 s	72 °C
zurück zu Schritt 2, 28x		
finale Elongation	2 min	72 °C

### **2.8.4 LFH-PCR**

Die LFH-PCR (*long flanking homology*; Wach, 1996) wurde dafür eingesetzt, gezielt innerhalb eines Gens eine Deletion einzufügen. Das Prinzip der LFH-PCR ist in **Abb. 5** schematisch dargestellt. Zunächst wurden in zwei Standard-PCR-Ansätzen zwei Bereiche homolog zum stromaufwärts und stromabwärts liegenden Bereich des entsprechenden Gens amplifiziert. Die hierfür zu verwendenden Oligonukleotidpaare (a, b und c, d) wurden derart konstruiert, daß zwei *Primer* (a, d) jeweils am 5'-Ende die Sequenz einer Restriktionsschnittstelle trugen, die eine spätere Klonierung des nach der *Joining*-PCR erhaltenen Fragments in ein

Plasmid ermöglichten, und zwei andere *Primer* (b, c) jeweils eine Sequenz von 20-30 Nukleotiden angehängt bekamen, die homolog zur Sequenz eines Resistenzvermittelnden Gens war. Das *up*- und *down*-Fragment wurde nach Reinigung zusammen mit dem ebenfalls über eine Standard-PCR amplifizierten und gereinigten Fragment des Resistenzoperons in einen Ansatz gegeben. Unter entsprechenden Bedingungen fusionierten die homologen Bereiche und das gesamte Fragment konnte durch Zugabe der *Primer* a und d amplifiziert werden. Die für die *Joining*-PCR eingesetzten Mengenverhältnisse verhielten sich 1:1:4 für das *up*-, *down*- und Resistenzoperon-Fragment. Die weiteren Zusätze entsprachen denen einer Standard-PCR. Für die *Joining*-PCR wurde die 'High Fidelity'-*Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Das durchlaufene PCR-Programm ist unten aufgeführt.

Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
Denaturierung	20 s	95 °C
Hybridisierung	40 s	variabel
Elongation	3 min	72 °C
Zurück zu Punkt 2, 10 Zyklen		
Denaturierung	20 s	94 °C
Hybridisierung	40 s	variabel
Elongation	3 min + 20 s/Zyklus	72 °C
Zurück zu Punkt 6, 25 Zyklen		
Finale Elongation	10 min	72 °C

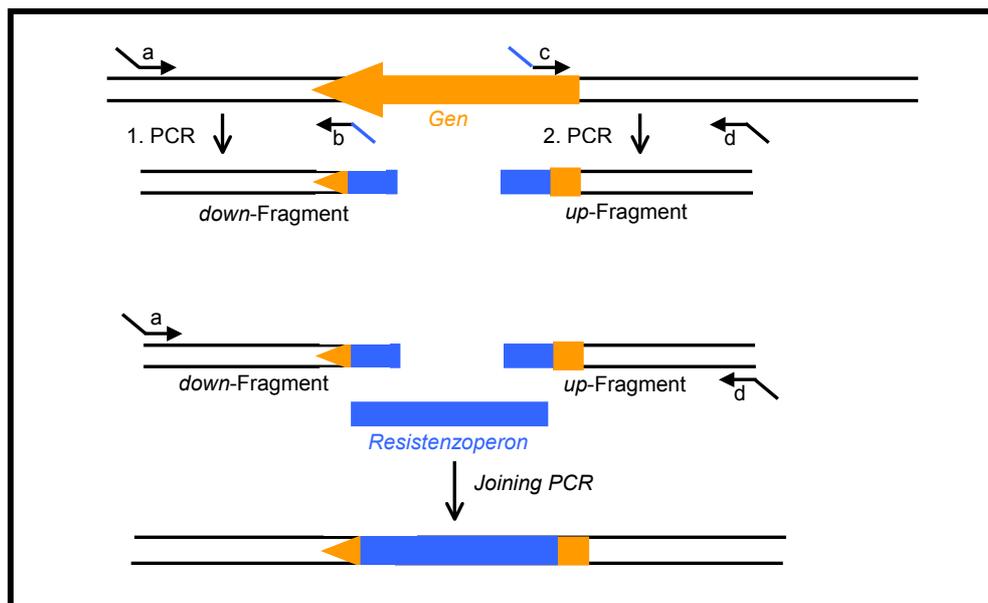


Abb. 5 Schematische Darstellung der LFH-PCR (Erläuterungen siehe Text)

## 2.9 Transformation

### 2.9.1 Transformation von *E. coli* (Inoue et al., 1990)

Zur Herstellung kaltkomptenter Zellen von *E. coli* wurde zunächst eine Stammkultur auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde anschließend in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und wiederum ÜN bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Diese Vorkultur wurde als Inokulum für die Hauptkultur, 250 ml SOB-Medium mit Antibiotikum, verwendet. Bei 18 °C wurde die Kultur so lange geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 (ca. 12-20 h) erreicht war. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Zellsediment wurde in 80 ml eiskaltem PIPES-Puffer gewaschen, 10 min auf Eis inkubiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 20 ml PIPES-Puffer aufgenommen und langsam, während einer 10minütigen Inkubation auf Eis, mit DMSO (1,5 ml, entspricht einer Endkonzentration von 7 %, v/v) versetzt. Aliquots von 200 µl wurden in vorgekühlte 1,5-ml-Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -70 °C konnten die Zellen ohne offensichtliche Verschlechterung der Transformationseffizienz gelagert werden.

Zur Transformation wurde die entsprechende Menge an Aliquots (200 µl/Transformation) auf Eis aufgetaut und Plasmid-DNA oder Ligationsansatz (bis 20 µl) hinzu pipettiert. Nach einer Inkubation von 30-40 min auf Eis wurden die Zellen einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, kurz auf Eis gekühlt und mit 800 µl LB-Medium versetzt. Sofort im Anschluß erfolgte eine Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln für 45-60 min. Im Falle der Transformation von Plasmiden wurden 20-50 µl des Ansatzes auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Erfolgte die Transformation mit Ligationsansatz, so wurde der Ansatz zentrifugiert (1000 Upm, 30 s, RT), 850 µl des Überstandes verworfen, die Zellen in den verbleibenden 150 µl Medium suspendiert und diese komplett auf Selektionsmedium ausplattiert.

#### PIPES-Puffer

Pipes	0,756	g	10	mM
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,42	g	15	mM
KCl	4,66	g	250	mM
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,72	g	55	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 125</b>	<b>ml</b>		

KCl und MnCl<sub>2</sub> wurden getrennt von Pipes und CaCl<sub>2</sub> autoklaviert.

### **2.9.2 Elektroporation von *E.coli* (Dower et al., 1988)**

Durch Elektroporation kann DNA im Vergleich zu künstlich induzierter Transformation mit höherer Effizienz übertragen werden. Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 250 ml LB-Medium mit der ÜN-Vorkultur des entsprechenden Stammes angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Bei dem Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub> wurden die Kultur 15 min auf Eis gekühlt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Sediment wurde 2x mit 250 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen, wobei darauf zu achten war, daß die Waschschriffe schnell durchgeführt wurden, um ein Lysieren der Zellen zu vermeiden. Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe in 10-30 ml eiskaltem Glycerin (10 %, v/v). Das Zellsediment wurde schließlich in 1 ml eiskaltem Glycerin (10 %, v/v) aufgenommen und die Zellsuspension in 50-µl-Aliquots entweder sofort zur Elektroporation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -70 °C konnten die Zellen bis zu drei Monaten gelagert werden.

Zur Elektroporation wurde die entsprechende Menge an Aliquots (50 µl/Transformation) auf Eis aufgetaut und in eine geeignete, eisgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) pipettiert. Um intakte Plasmide zu transformieren, wurden i. d. R. 100 pg Plasmid-DNA, bei der Elektroporation von *E. coli* ER2275 [pAN1]-Zellen 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Ligationsansätze mußten vor der Transformation dialysiert werden, wenn mehr als 100 ng DNA pro Transformationsansatz verwandt wurden. Die DNA wurde auf Eis zu den Zellen gegeben und der Ansatz sofort elektroporiert. Die gewählten Einstellungen für die Elektroporation waren:

Spannung	2,5 kV
Kapazität	25 µF
Widerstand	200 Ω

Die Zeitkonstante lag zwischen 4,6 und 4,9 ms. Nach dem Puls wurde dem Ansatz sofort 1 ml LB-Medium zugegeben, die Zellsuspension in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und dieses für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Aliquots von 100-250 µl wurden anschließend auf LB-Selektionsmedium ausplattiert.

### **2.9.3 Elektroporation von *C. acetobutylicum* (Nakotte et al., 1998; mod.)**

Die Elektrotransformation von *C. acetobutylicum* erfolgte in Anlehnung an die Methode von Nakotte et al. (1998). Um Zellen für die Elektroporation vorzubereiten, wurden 5 ml 2x YTG-Medium in Hungate-Röhrchen mit ca. 50 µl einer zuvor auf 75 °C erhitzten Sporensuspension beimpft und ÜN bei 37 °C stehend inkubiert. Mit der gut gewachsenen Kultur wurden 50 ml 2x YTG-Medium beimpft

und bei 37 °C stehend so lange inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 (logarithmisch wachsende Zellen) erreicht hatten. Die folgenden Schritte wurden in einer Anaerobenkammer eigener Bauart vorgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet, das Sediment in kaltem HEB-Puffer mit MgCl<sub>2</sub> (5 mM) vorsichtig suspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 2 ml kaltem HEB-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> aufgenommen und je 600 µl Zellsuspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,4 cm) überführt, in die zuvor bereits die Plasmid-DNA (3-15 µl, 1-10 µg) vorgelegt worden war. DNA und Zellen wurden durch vorsichtiges Aufziehen mit der Pipette gemischt und der Ansatz sofort elektroporiert. Die Einstellungen für die Elektroporation waren wie folgt:

Spannung	1,8 kV
Kapazität	50 µF
Widerstand	600 Ω

Unter diesen Bedingungen lag die Zeitkonstante bei 5-16 ms. Die Zellen wurden anschließend in ein Hungate-Röhrchen mit 1,5 ml 2x YTG-Medium überführt und mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert. 250-300 µl wurden daraufhin auf 2x YTG-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und/oder zum Animpfen von entsprechendem Selektionsmedium verwandt.

Um eine Degradation der eingesetzten DNA zu unterbinden, erfolgte vor der Elektrotransformation von Plasmid-DNA in *C. acetobutylicum* eine *in vivo*-Methylierung der Plasmide in *E. coli* ER2275 [pAN1]. Die durch die auf dem Plasmid pAN1 kodierte Methyltransferase des *B. subtilis*-Phagen Φ3T (Mermelstein und Papoutsakis, 1993) modifizierte DNA konnte nicht mehr durch das Restriktionsenzym *SatI* geschnitten werden. Da das Plasmid pAN1 in Gram-positiven Organismen nicht repliziert wird, konnte die Transformation mit Gemischen der Plasmide durchgeführt werden.

#### HEB-Puffer

Hepes	2 g	7 mM
Saccharose	111,7 g	272 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1200 ml	

### **2.9.4 Transformation von *S. cerevisiae***

**(Ito et al. 1983; Schiestl und Gietz, 1989; Hill et al., 1991; Gietz et al., 1992)**

Eine einfache Methode der Transformation von Hefezellen ist die Lithium-Acetat-Methode. Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurden 50 ml YPD- und/oder SD-Medium mit einer Kolonie von *S. cerevisiae* beimpft und ÜN unter Schütteln (150 Upm) bei 30 °C inkubiert. 30 ml dieser Kultur dienten als Inokulum (Anfangs-OD<sub>600</sub> 0,2-0,3) für die Anzucht einer 300-ml-Kultur. Diese wurde so lange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 erreicht war (ca. 3 h). Bei Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub> wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT) geerntet, mit TE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 1,5 ml 1x TE/1x LiAc-Puffer suspendiert. In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden zur Transformation linearer DNA 1-4 µg DNA und 0,1 µg Heringssperma-DNA und zur Transformation circolärer DNA 0,1 µg Plasmid-DNA und 0,1 µg Heringssperma-DNA vorgelegt. Zu der DNA wurden 100 µl frisch hergestellte kompetente Hefezellen gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden zu dem Ansatz 600 µl PEG/LiAc-Lösung gegeben, 10 s gemischt und unter Schütteln 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte eine Zugabe von 70 µl DMSO und ein vorsichtiges Mischen durch Invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach einem 15minütigen Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurde der Ansatz für 1-3 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (13000 Upm, 30 s, RT) und das Zellsediment in 500 µl TE-Puffer gelöst. Der gesamte Ansatz oder Aliquots des Ansatzes wurden auf entsprechenden Selektionsmedium-Platten ausplattiert und diese bei 30 °C inkubiert.

#### **PEG/LiAc-Lösung (frisch)**

PEG 4000 (50 %)	8 ml	40	% (v/v)
TE-Puffer (10x)	1 ml	1	x
<b>LiAc-Lösung (10x, 1M) ad 10 ml</b>		<b>1</b>	<b>x</b>

### **2.10 RNA-Transfer auf Nylonmembran (*Northern blot*)**

Der Vakuumtransfer von im denaturierenden Agarosegel (2.6.2) aufgetrennter RNA auf eine Nylonmembran ('Hybond<sup>TM</sup>-N+' oder 'Hybond<sup>TM</sup>-N'; Amersham Bioscience Europe GmbH; Freiburg) erfolgte mit Hilfe eines 'Vacugene<sup>®</sup>XL Vacuum Blotting Systems' (Amersham Bioscience Europe GmbH; Freiburg). Auf die mit Wasser angefeuchtete poröse Trägerplatte (glänzende Seite nach oben) wurde die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran und darauf eine Plastik-

maske gelegt. Die Plastikmaske überlappte die Membran ringsherum 5 mm. Abschließend wurde das Agarosegel paßgenau aufgelegt und 50-55 mbar Vakuum angelegt. Sofort nach dem Einschalten der Vakuumpumpe wurde das Gel für 5 min mit Denaturierungslösung überschichtet. Die Lösung wurde auf Grund der durch das Vakuum bedingten Wannenform des Gels am Abfließen gehindert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Denaturierungs- durch die Neutralisierungslösung ersetzt und wiederum für 5 min auf dem Gel belassen. Der eigentliche Transfer erfolgte im Anschluß daran für 2 h mit 20x SSC-Puffer. Nach Beendigung wurde die restliche Flüssigkeit von dem Gel abgekippt und abgenommen, das Vakuum ausgeschaltet und das Gel entfernt. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurde das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Die Membran wurde 10 min in 20x SSC-Puffer gewaschen, um Agarosereste zu entfernen, luftgetrocknet und die RNA anschließend durch eine Inkubation für 2 h bei 80 °C bzw. ÜN bei 60 °C auf der Membran fixiert.

#### Denaturierungslösung

NaCl	0,58	g	10	mM
NaOH	2	g	50	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

#### Neutralisierungslösung

Tris/HCl (1 M, pH 7,4)	100	ml	100	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		<b>pH 7,4</b>

#### 20x SSC-Puffer

NaCl	0,04	g	0,75	mM
Na <sub>3</sub> Citrat	19,4	g	75	mM
NaOH	0,4	g	10	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		<b>pH 11,5</b>

### 2.11 RNA-Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde

Die mit RNA beladene Nylonmembran wurde für mind. 1 h bei 55 °C mit frisch angesetzter Hybridisierungslösung prähybridisiert. Daraufhin wurde die unmittelbar zuvor denaturierte (5 min, 95 °C) DNA-Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 55 °C. Die Membran wurde anschließend 2mal 5 min bei 55 °C mit

2x SSC-Puffer, 2mal 5 min bei RT mit 2x SSC und 0,1 % (w/v) SDS und 2mal 5 min bei RT mit 0,1x SSC und 0,1 % (w/v) SDS gewaschen, in Haushaltsfolie eingewickelt und in Abhängigkeit von der Stärke des Signals für 2-48 h zusammen mit einem Röntgenfilm ('AGFA CRONEX 5', Agfa-Gevaert N. V.; Mortsel, Belgien) inkubiert.

#### Hybridisierungspuffer (5x)

Polyvinylpyrrolidon K90	1	g	1	% (w/v)
Ficoll 400	1	g	1	% (w/v)
BSA	1	g	1	% (w/v)
Tris-HCl (1 M, pH 7,5)	25	ml	250	mM
Na-Pyrophosphat	0,5	g	0,5	% (w/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

Der Puffer wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

#### Hybridisierungslösung

Hybridisierungspuffer (5x)	2 ml
Dextransulfat (50 %,w/v)	2 ml
SDS (10 %, w/v)	1 ml
H <sub>2</sub> O	4 ml

Die Komponenten wurden gemischt und für 15 min in einem Wasserbad auf 65 °C erwärmt. Anschließend wurden 0,58 g NaCl (1 M) zugegeben.

## 2.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA mit dem 'LI-COR®-Sequencer'

Die automatische, nicht-radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA zur Überprüfung von Klonierungen erfolgte mit dem 'Li-COR®-Sequencer'. Die in der Sequenzierreaktion erzeugten DNA-Moleküle waren durch die Verwendung IRD800-markierter *Primer* im Infrarotbereich anregbar, so daß eine Detektion während des Gellaufs mit Hilfe eines sich horizontal bewegenden Infrarotlasers möglich war. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit dem Programm Base ImagIR Data Collection, die Auswertung mit dem Programm Base ImagIR Image Analysis (Vers. 2.3).

Die Sequenzierreaktion wurde nach der Methode des *cycle sequencing* mit Hilfe des 'SequiTherm EXEL™II Long Read™ Sequencing KIT-LC' durchgeführt, wobei

die Anweisungen des Herstellers befolgt wurden. Die fertige Sequenzierreaktion konnte bei -20 °C gelagert oder direkt nach fünfminütiger Denaturierung bei 95 °C analysiert werden. Die Analyse von 1 µl der Sequenzierreaktion erfolgte in einem Polyacrylamidgel (6 %, w/v, 41cm x 0,025 cm) mit unten aufgeführter Zusammensetzung. Die Auftrennung erfolgte ÜN bei 1500 V, 37 mA, 50 W und 50 °C.

**Polyacrylamidgel 6 % (w/v)**

SequaGel XR	30	ml
SequaGel XR-Pufferlösung	7,5	ml
DMSO	400	µl
APS (10 %, w/v)	300	µl

**2.13 Heterologe Überproduktion von Proteinen in *E. coli***

Die heterologe Überproduktion von Proteinen in *E. coli* erfolgte unter Verwendung des Expressionsvektors pET29a(+) bzw. pET31(+). Diese zeichnen sich durch einen IPTG-induzierbaren  $P_{tac}$ -Promoter aus, der in Abwesenheit des Induktors durch konstitutive Expression des ebenfalls auf dem Plasmid kodierten *lacI<sup>q</sup>*-Repressorgens effizient reprimiert wird. Das pET-System hat den Vorteil, daß es durch Zusammenwirken von Expressionsstamm und -plasmid zu einer sehr geringen Hintergrundexpression und damit Proteinproduktion kommt. Das Gen für die T7 RNA-Polymerase, die den  $P_{tac}$ -Promoter kontrolliert, liegt auf dem Chromosom des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) und unterliegt dort wiederum der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters, der ebenfalls durch IPTG induziert werden kann. Durch das Einbringen des gewünschten Gens in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors erfolgt ein Anhängen von 6 Histidinen an den C-Terminus des produzierten Proteins.

Zur Überexpression des Proteins wurden 50-500 ml LB-Medium mit 1-10 ml einer ÜN-Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stamms beimpft und unter Antibiotikumselektion bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,6-1,4 erfolgte die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Die Kultur wurde weitere 3-4 h inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (5000 Upm, 4 °C, 20 min) geerntet. Eine Probennahme erfolgte direkt vor der Induktion und in regelmäßigen Abständen nach der Induktion mit IPTG. Hierfür wurde 1 ml Zellsuspension entnommen und auf Eis bzw. bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Analyse wurden 10-50 µl Probe mit 2-15 µl Probenauftragspuffer (2.17.1) versehen, für 5-10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel (2.17.1) aufgetrennt.

## 2.14 Herstellung von Rohextrakten

Zur Herstellung von Rohextrakten wurden die Zellen nach der Ernte durch Zentrifugation (5000 Upm. 10 min, 4 °C) einmal mit dem, für die folgenden Anwendungen, notwendigen Aufschlußpuffer gewaschen und je nach Kulturvolumen in 800 µl-10 ml des jeweiligen Puffers aufgenommen.

### 2.14.1 Zellaufschluß mit der 'French<sup>®</sup> Press'

Zellsedimente aus Kulturvolumina > 50 ml, die in bis zu 4 ml des jeweiligen Aufschlußpuffers aufgenommen wurden, wurden mit der 'kleinen French<sup>®</sup> Pressure Cell' aufgeschlossen. Zellsedimente, die in mehr als 4 ml Aufschlußpuffer aufgenommen wurden, wurde mit der 'großen French<sup>®</sup> Pressure Cell' aufgeschlossen. Der Zellaufschluß erfolgte in einer vorgekühlten 'French<sup>®</sup> Pressure Cell', die in die 'French<sup>®</sup> Press' eingesetzt wurde, bei einem für die Zelle max anwendbaren Druck, 4 MPa für die 'kleine' Zelle und 13 MPa für die 'große' Zelle. Der Erfolg des Aufschlusses wurde mikroskopisch kontrolliert, wobei bis zum annähernd vollständigen Aufschluß bis zu 6 Durchgänge erforderlich waren. Der nach Ultrazentrifugation (45000 Upm, 1,5 h, 4 °C), zur vollständigen Abtrennung aller Zelltrümmer, erhaltene Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei 4 °C (max. ÜN) gelagert.

### 2.14.2 Zellaufschluß mit dem 'RiboLyser'

Bei einem aus kleineren Kulturvolumina (bis 50 ml) erhaltenen Sediment erfolgte der Aufschluß durch einen 'RiboLyser'. Hierfür wurden das Zellsediment in max. 800 µl Aufschlußpuffer aufgenommen und in ein 2-ml-Schraubdeckelröhrchen überführt, das zuvor mit 250 mg Glaspartikeln (150-212 µm) gefüllt worden war. Zum mechanischen Aufschluß wurde der Ansatz in das Gerät eingesetzt und bei max. Stärke (6,5) für 30 s behandelt, wobei der Vorgang mind. 3mal wiederholt wurde. Zwischen den Durchgängen wurde der Ansatz, auf Grund der starken Wärmeentwicklung, auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte wie bei dem Aufschluß über eine 'French<sup>®</sup> Press' eine Ultrazentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer und in diesem Fall der Glaspartikel.

## 2.15 Isolierung bakterieller Membran- und Cytosolproteine

Für die getrennte Isolierung bakterieller Cytosol- und Membranproteine erfolgte der Zellaufschluß mit dem 'RiboLyser' in Lösung 1 (20 mM Kaliumphosphatpuffer

[pH 7,4], 5 mM Na-EDTA, 50 mM KCl). Nach Ultrazentrifugation (45000 Upm, 1 h, 4 °C) wurde der Überstand mit 0,2 Vol. Glycerin (70 %, v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert. Hierin befanden sich die im Cytosol gelösten Proteine. Das Sediment wurde in 1,5 ml Lösung 2 (50 mM Trisacetatpuffer [pH 7,4], 1 mM Na-EDTA, 0,8 M KCl) aufgenommen und erneut ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Sediment in 100 µl Lösung 3 (0,1 M Kaliumphosphatpuffer [pH 7,4], 1 mM Na-EDTA) aufgenommen, mit 0,2 Vol. Glycerin (70 %, v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert. Hierin befanden sich die in der Membran lokalisierten und/oder verankerten Proteine. Aliquots der eingefrorenen Fraktionen wurden im SDS-Poly-acrylamidgel (2.17.1) analysiert.

## **2.16 Reinigung und Konzentrierung von Proteinlösungen**

### **2.16.1 Dialyse**

Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch in folgenden Lösungen aufgeköcht:

1. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 %, w/v)
2. H<sub>2</sub>O
3. EDTA (2 mM)
4. H<sub>2</sub>O

Im Anschluß wurden die Schläuche bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert. Die Dialyse erfolgte unter langsamen Rühren gegen 1000faches Puffervolumen bei 4 °C für 5-12 h. Falls notwendig, wurde ein- bis zweimal ein Pufferwechsel vorgenommen.

### **2.16.2 Pufferwechsel**

Der Puffer von Proteinlösungen wurde unter Anwendung von 'PD10'-Säulen entsprechend den Angaben des Herstellers gewechselt.

### **2.16.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)**

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen fand die Methode nach Bradford (1976) Anwendung. Zu 10 µl Probe wurde 1 ml Bradfordreagenz gegeben und nach 20 min Inkubation bei RT die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden BSA-Lösungen definierter Konzentration eingesetzt.

## 2.17 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

### 2.17.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970; mod.)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen diente der Proteinüberexpressions- und Proteinreinheitskontrolle sowie der Molekularmassenbestimmung gereinigter Proteine. Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden mit einer Plattengelapparatur der Größe 11 x 7 x 0,1 cm durchgeführt. Die Gele setzten sich jeweils aus einem Trenn- und einem 1 cm langen Sammelgel zusammen, die sich in pH-Wert, Acrylamidkonzentration und der Ionenstärke der beteiligten Puffer unterschieden. Die jeweilige Zusammensetzung ist **Tab. 13** zu entnehmen. Das Trenngel wurde bis etwa 1 cm unterhalb der Oberkante der Ohrenplatte gegossen und zur Ausbildung einer planen Oberfläche mit Butanol überschichtet. Sobald das Trenngel auspolymerisiert war (ca. 45 min), erfolgte das Gießen des Sammelgels und das Einsetzen des Kamms. Nach Auspolymerisation (ca. 45 min) wurden das Gel in die Apparatur eingesetzt und die Kammern so lange mit Laufpuffer befüllt, bis das Gel oben und unten in den Puffer eintauchte. Anschließend wurden der Kamm gezogen und die Taschen sorgfältig mit Laufpuffer gespült. Um eine gleichmäßige Lauffront zu erhalten, wurden mit einer Spritze die Luftblasen, die sich am unteren Teil des Gels zwischen den Glasplatten gebildet hatten, entfernt.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese im Verhältnis 5:1 mit Probenaufragspuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Das Auftragen der Proben erfolgte mit einer Mikroliterspritze oder einer Pipette. Die Elektrophorese wurde mit 80-90 V gestartet, und sobald die Proben in das Trenngel eingelaufen waren, konnte die Spannung bis auf 130 V erhöht werden. Die Elektrophorese war beendet, sobald die Bromphenollaufront das Ende des Gels erreicht hatte.

**Tab. 13 Zusammensetzung der Gellösungen für die SDS-PAGE**

Acrylamidkonzentration (w/v)		10 %	12 %	Sammelgel (4 %)
Acrylamid (40 %, w/v)	[ml]	1,9	2,6	0,44
N,N'-Methylenbisacrylamid (2 %, w/v)	[ml]	0,95	2,5	0,22
Tris-HCl (2,17 M, pH 8,8)	[ml]	1,5	1,5	--
Tris-HCl (1,25 M, pH 6,8)	[ml]	--	--	0,5
H <sub>2</sub> O	[ml]	3,05	2,6	3,75
SDS-Lösung (10 %, w/v)	[µl]	75	75	50
TEMED	[µl]	10	10	10
APS-Lösung (10 %, w/v), frisch	[µl]	50	50	50

**SDS-Elektrophorese Laufpuffer (10x)**

Tris	30,3	g	0,25	M
Glycin	144,2	g	1,92	M
SDS	10	g	1	% (w/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

**SDS-Probenauftragspuffer (5x)**

Tris/HCl (1 M, pH 6,8)	2,5	ml	250	mM
DTT	0,25	g	2,5	%
SDS	1	g	10	%
Bromphenolblau	Spatelspitze			
Glycerin (87 %, v/v)	5,75	ml	50	%
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 10</b>	<b>ml</b>		

**2.17.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Analyse von Protein-DNA-Interaktionen wurden native Polyacrylamidgele (5 %, w/v und 8 %, w/v) in unten aufgeführter Zusammensetzung in einem TBE-Puffersystem eingesetzt.

**Natives Polyacrylamidgel für den 'LI-COR®-Sequencer'**

	<b>5</b>	<b>%</b>
Acrylamid (40 %,w/v)	2,5	ml
N, N-Methylenbisacrylamid (2 %, w/v)	625	µl
TBE (5%)	1	ml
H <sub>2</sub> O	15,7	ml
TEMED	20	µl
APS (10 %, w/v), frisch	200	µl

**Natives Polyacrylamidgel für Biometra-**

<b>Kammern</b>	<b>8</b>	<b>%</b>
Acrylamid (40 %,w/v)	4,4	ml
N, N-Methylenbisacrylamid (2 %, w/v)	3,0	ml
TBE (5x)	4,5	ml
H <sub>2</sub> O	10,6	ml
TEMED	12	µl
APS (10 %, w/v), frisch	113	µl

### **2.17.3 Größenbestimmung von im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinen**

In der denaturierenden PAGE erfolgt die Auftrennung der Proteine auf Grund der Denaturierung und des angelagerten SDS zum überwiegenden Teil nach der Größe der jeweiligen Proteine; die individuelle Ladung der Proteine darf auf die Trennung keinen Einfluß haben. Das Detergenz SDS zerstört die native Struktur der Proteine und entfaltet sie zu einer frei beweglichen Kette. Durch kovalente Anlagerung des SDS an hydrophobe Bereiche des Proteins wird dieses proportional zu seiner Größe und damit zu seiner molekularen Masse mit negativen Ladungen besetzt. Für die Bestimmung der molekularen Masse eines Proteins wird seine relative Beweglichkeit in bezug auf Standardproteine mit bekannter molekularer Masse verglichen, so daß die Masse abgeschätzt werden konnte. Es wurde die 'PageRuler™ Prestained Protein Ladder' verwandt. Die Proteine waren bereits vorgefärbt, so daß während des Gellaufs die Trennung verfolgt werden konnte. Ein weiterer Vorteil dieses Markers war, daß der Marker bei einem Transfer auf eine Membran seine Farbe nicht verlor und so auch bei immunologischen Nachweisen zum Größenvergleich herangezogen werden konnte.

## **2.18 Proteinfärbungen**

### **2.18.1 Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969; mod.)**

Die Coomassie-Färbung eignet sich zum Nachweis von Proteinen, die eine Konzentration von 100 ng pro Bande nicht unterschreiten. Das SDS-Polyacrylamidgel (2.17.1) wurde vom Sammelgel befreit und für 30 min unter leichtem Schütteln bei RT in Coomassie-Färbelösung und anschließend zur Entfärbung des Hintergrunds ÜN in Entfärber-Lösung inkubiert. Für eine bessere Entfärbung wurde zusätzlich Zellstoffpapier in die Metallschale mit dem Gel und der Entfärber-Lösung gelegt, das den aus dem Gel gewaschenen Farbstoff aufsaugte und so aus der Lösung entfernte. Die Entfärberlösung wurde, falls notwendig, gewechselt und konnte über einen Aktivkohlefilter regeneriert werden. Die Coomassie-Färbelösung konnte nach Reinigung über einen Faltenfilter ebenfalls wiederverwendet werden. Nach dem Erreichen des gewünschten Entfärbegrads wurde das Gel unter Verwendung einer Video-dokumentationsanlage photographiert und das Bild digitalisiert. Sollten fertige Gele aufbewahrt werden, so wurden sie in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

**Färbelösung für Polyacrylamidgele**

Coomassie Brilliant Blue G250	8	g	0,8	% (w/v)
Serva Blau R	8	g	0,8	% (w/v)
Methanol	450	ml	45	% (v/v)
Eisessig	75	ml	7,5	% (v/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

**Entfärberlösung für Polyacrylamidgele**

Eisessig	100	ml	10	% (v/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

Eine ca. fünffach sensitivere Färbung erhielt man mit colloidalem Coomassie. In diesem Fall wurde ein 'Colloidal Blue Coomassie<sup>TM</sup> Staining Kit' nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Ein weiterer Vorteil dieser Färbung bestand darin, daß sie kompatibel mit einer MALDI-TOF-Analyse war.

**2.18.2 Silberfärbung (Blum et al., 1987; mod.)**

Die Silberfärbung erlaubt den Nachweis von Proteinen bereits ab einer Konzentration von 2-5 ng pro Bande. Alle Schritte dieser Färbung wurden bei RT durchgeführt. Zunächst wurde das Polyacrylamidgel vom Sammelgel befreit und für min 30 min in Fixierlösung inkubiert, wobei die Inkubation auch ÜN durchgeführt werden konnte. Anschließend folgte ein zweimaliges Waschen für je 10 min mit Ethanol (50 %, v/v), eine exakt einminütige Inkubation in Thiosulfatlösung, ein dreimaliges Waschen für je 20 s mit H<sub>2</sub>O (nur demin. H<sub>2</sub>O verwenden!) und eine 15minütige Inkubation in frischer Silbernitratlösung. Eine Inkubation in Entwicklerlösung wurde anschließend so lange durchgeführt, bis die Proteinbanden die gewünschte Intensität aufwiesen. Durch Überführung des Gels in Stopplösung wurde die Entwicklung abgebrochen. Mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage wurde das Gel photographiert und das Bild digitalisiert. Sollten fertige Gele aufbewahrt werden, so wurden sie in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

**Fixierlösung**

Methanol	500	ml	50	% (v/v)
Eisessig	120	ml	12	% (v/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

Zugabe von 50 µl Formaldehyd (37 %, v/v) direkt vor Gebrauch

**Thiosulfatlösung**

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,2	g	0,02	% (w/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		

**Silbernitratlösung**

AgNO <sub>3</sub>	0,2	g	0,02	% (w/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		

Zugabe von 75 µl Formaldehyd (37 %, v/v) direkt vor Gebrauch

**Entwicklerlösung**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6	g	6	% (w/v)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2	ml	0,0004	% (w/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		

Zugabe von 50 µl Formaldehyd (37 %, v/v) direkt vor Gebrauch

**Stopplösung**

Na-EDTA	18,6	g	50	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

**2.19 Phosphorylierung von Proteinen**

Das gewünschte Protein wurde, wie bei Baldus et al. (1994) beschrieben, phosphoryliert, indem es für 30 min bei RT zusammen mit 50 mM Acetylphosphat, gelöst in entsprechendem Puffer, inkubiert wurde. Das phosphorylierte Protein wurde sofort in weiterführenden Experimente eingesetzt.

## 2.20 Affinitätschromatographie

### 2.20.1 DNA-Affinitätschromatographie

Die DNA-Affinitätschromatographie wurde zur Anreicherung DNA-bindender Proteine eingesetzt. Als Trägermaterial wurden 'Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin' (*Beads*) verwendet. Unter Verwendung eines 'DYNAL MPC-E Konzentrators' konnten die *Beads*, auf Grund ihrer magnetischen Eigenschaft, in den einzelnen Schritten separiert werden.

#### 2.20.1.1 Kopplung der Sonde an 'Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin'

Im ersten Schritt galt es, das DNA-Fragment, das als Sonde für die Anreicherung des Proteins bzw. der Proteine dienen sollte, an die *Beads* zu koppeln, wobei die Fragmentlänge für die folgenden Angaben 500 Bp nicht überschreiten sollte. Die Herstellung der Sonde erfolgte über einen PCR-Ansatz. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit Hilfe eines biotinylierten und eines normalen Oligonukleotids amplifiziert. Die nicht eingebauten Primer wurden über eine Reinigung des PCR-Ansatzes über 'Microcon<sup>®</sup> YM-30'-Konzentratoren entfernt. Ca. 100-200 pmol biotinylierte DNA wurden nach folgendem Protokoll an 2,5 mg *Beads* gekoppelt. Dazu wurden 250 µl *Beads* (10 mg/ml) im Magnetseparator vom Aufbewahrungspuffer (PBS [pH 7,4], 0,1 % BSA, 0,02 % NaN<sub>3</sub>) abgetrennt und anschließend zweimal mit je 400 µl PBS-Puffer gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 400 µl 2x DNA-Bindepuffer wurden die *Beads* im Verhältnis 1:1 mit der DNA und dem 2x DNA-Bindepuffer gemischt und unter gelegentlichem Schwenken für 1-2 h oder ÜN bei RT inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Kopplung der DNA an die *Beads*. Nicht gebundene DNA wurde durch zweimaliges Waschen der *Beads* mit je 400 µl 1x DNA-Bindepuffer entfernt. Wurden die mit DNA gekoppelten *Beads* nicht direkt für die DNA-Affinitätsreinigung eingesetzt, so wurden sie in TE-Puffer bei 4 °C gelagert.

#### **DNA-Bindepuffer (2x)**

Tris/HCl (0,1 M, pH 7,4)	10	ml	10	mM
EDTA (10 mM)	10	ml	1	mM
NaCl	11,7	g	2	M
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		<b>pH 7,5</b>

### 2.20.1.2 Durchführung der DNA-Affinitätsreinigung

Die Anreicherung DNA-bindender Proteine erfolgte unter Verwendung der, mit entsprechender DNA gekoppelten, *Beads*, die bis zu drei Mal wiederverwendbar waren. Die *Beads* wurden in Protein-Bindepuffer äquilibriert und für 1-2 h bei RT mit dem vorbehandelten Rohextrakt inkubiert. Der Rohextrakt wurde aus in kontinuierlicher Kultur gewachsenen Zellen (zur Verfügung gestellt von Michael Böhringer) gewonnen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte in einer 'French® Press' (2.14.1). Dem Aufschluß wurde eine Ultrazentrifugation (45000 Upm, 1,5 h, 4 °C) angeschlossen und der Rohextrakt anschließend zur Konzentrierung in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) mit 15 % PEG ÜN dialysiert. Nicht gebundene Proteine wurden nach Abschluß der Inkubation des Rohextrakts mit den *Beads* durch mind. dreimaliges Waschen der *Beads* mit Protein-Bindepuffer abgetrennt. Mit je 20 µl Protein-Elutionspuffer unterschiedlicher Salzkonzentration (200-1000 mM NaCl) wurden gebundene Proteine anschließend stufenweise eluiert. Die erhaltenen Proteinfractionen wurden bei 4 °C gelagert oder direkt in einem SDS-Polyacrylamidgel (2.17.1) analysiert.

#### **Protein-Bindepuffer**

Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4)	20	ml	20	mM
EDTA (10 mM)	10	ml	1	mM
DTT (100 mM)	1	ml	1	mM
NaCl	0,58	g	100	mM
Glycerin	33	ml	10	% (v/v)
Triton X100	50	µl	0,05	% (v/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		<b>pH 8,0</b>

#### **Protein-Elutionspuffer**

Die Zusammensetzung des Protein-Elutionspuffers entspricht der des Protein-Bindepuffers. Lediglich die Konzentration an NaCl wurde angepaßt.

### 2.20.2 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Um rekombinante Proteine zu reinigen, die N- oder C-terminal mit 6 Histidinresten versehen wurden, fand die Affinitätschromatographie an immobilisiertem Nickel Anwendung, welches eine hohe Affinität zu Histidin aufweist. Das Trägermaterial Nickel-Nitrilotrichloressigsäure (Ni-NTA) enthält ein Ni<sup>2+</sup>-Ion, welches mit 4 seiner 6 Koordinationsstellen an die Gelmatrix (Agarose) gebunden ist. Die übrigen freien Koordinationsstellen erlauben die Bindung zweier benachbarter Histidinreste des

rekombinanten Proteins. Das gebundene Protein kann mit dem Strukturanalogon Imidazol von dem Material eluiert werden (Schmitt et al., 1993).

Für die native Reinigung im präparativen Maßstab wurde eine leere 10-ml-Plastiksäule mit so viel Gelmaterial gepackt, daß das Bettvolumen 1-1,5 ml betrug. Gegen das Auslaufen des Gelmaterials wurde die Säule nach unten hin mit Filterpapier abgedichtet. Auf eine solche Säule konnten bis zu 200 mg Gesamtprotein aufgetragen werden. Anschließend wurde das Material mit 10 Bettvolumen (BV) 10 mM Imidazol-Puffer äquilibriert. Die Zellen wurden nach der Ernte für den Aufschluß über die 'French® Press' (2.14.1) in 10 mM Imidazol-Puffer (7-10 ml) aufgenommen. Der ultrazentrifugierte (45000 Upm, 1,5 h, 4 °C) Rohextrakt wurde auf die Säule gegeben und tropfte nach dem Einlaufen langsam mit Hilfe der Schwerkraft durch das Säulenmaterial. Nach Waschen der Säule mit 10 BV 10-20 mM Imidazol-Puffer erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit einem Stufengradienten von 50-250 mM Imidazol-Puffer. Die Eluate wurden in 1-ml-Fractionen gesammelt und ein Aliquot jeder Fraction in einem SDS-Polyacrylamidgel (2.17.1) analysiert. Die Fractionen, die überwiegend das gewünschte Protein enthielten, wurden entweder über PD10-Säulen (2.16.2) oder durch Dialyse (2.16.1) einem Pufferwechsel unterzogen und konzentriert. Nach Abschluß der Reinigung wurde die Säule mit 10 BV 250 mM Imidazol-Puffer gewaschen und das Säulenmaterial in Ethanol (30 %, v/v) gelagert. Die Säule konnte für die Reinigung des gleichen Proteins 2-3mal wiederverwendet werden. War über den Stufengradienten die zur Elution des gewünschten Proteins erforderliche Imidazolkonzentration ermittelt, so erfolgte bei einer wiederholten Reinigung ein stringenteres Waschen mit der Imidazolkonzentration, die gerade noch nicht zur Elution des gewünschten Proteins führte. Auf diesem Weg konnten unspezifisch bindende Proteine effektiv abgetrennt werden.

#### Imidazol-Puffer (10 mM)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,9	g	50	mM
NaCl	17,54	g	300	mM
Imidazol	0,68	g	10	mm
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

Für die Herstellung von Imidazol-Puffern anderer Imidazolkonzentrationen wurde eine Imidazol-Stammlösung (300 mM) hergestellt und entsprechend mit NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaCl-Puffer gemischt.

Eine denaturierende und/oder native Aufreinigung rekombinanter *his-tag*-Proteine im analytischen Maßstab erfolgte entsprechend den Angaben aus *The*

*QIAexpressionist- a handbook für high level expression and purification of the 6xHis-tagged proteins*, Qiagen GmbH; Hilden).

## 2.21 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (*Western blot*) (Kyhse-Andresen, 1984)

Für den Transfer auf Nitrocellulose-Membranen ('Hybond™ ECL™', Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg) wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach erfolgter Elektrophorese (2.17.1) vom Trenngel befreit und min. 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran und sechs Lagen 'Gel-Blotting-Papier GB002' (Schleicher und Schuell, Dassel) wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte nach dem semy-dry-Verfahren mittels einer 'Multiphor II- Elektrophoreseeinheit mit Novablot Electrophoresis Transfer Unit'. Die Graphitelektroden wurden mit nassen Tüchern mit Transferpuffer angefeuchtet. Auf der Anodenseite wurden in nachstehender Reihenfolge luftblasenfrei drei Lagen transferpuffergesättigtes 'Gel-Blotting'-Papier, die Nitrocellulosemembran, das äquilibrierte Gel sowie drei weitere Lagen Gel-Blotting-Papier geschichtet. Überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die Kathode wurde aufgelegt und der Transfer in Abhängigkeit von der Gelfläche (0,8 mA/cm<sup>2</sup>) durchgeführt. Die Membran wurde nach dem Transfer sofort für die Proteindetektion mit Antikörpern eingesetzt.

### Transferpuffer

Tris	3,03	g	25	mM
Glycin	14,41	g	192	MM
Methanol (99 %,v/v)	50	ml	5	% (v/v)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		

## 2.22 Detektion rekombinanter *his-tag*-Fusionsproteine mit Antikörpern

Der Nachweis rekombinanter *his-tag*-Fusionsproteine erfolgte durch den Einsatz von zwei Antikörpern. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran (2.21) ÜN in Magermilch (5 %, w/v) abgeblockt und anschließend 3mal 5 min mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran in 10 ml frischen PBS-Puffer mit 1 % *Blocking*-Reagenz überführt und nach Zugabe von 20 µl 1:500 verdünntem

monoklonalen Antikörper aus der Maus gegen den *his-tag* (Anti-His<sub>6</sub>, Roche Diagnostics GmbH; Mannheim) für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen, 3mal je 5 min mit PBS-Puffer, wurde die Membran erneut in 10 ml frischen PBS-Puffer mit 1 % *Blocking*-Reagenz überführt und nach Zugabe von 2 µl des zweiten Antikörpers wiederum für 1 h inkubiert. Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Esel-Anti-Maus Antikörper (Dianova GmbH; Hamburg). Die Meerrettich-Peroxidase ist ein Enzym, das ein nicht-fluoreszierendes Substrat in ein intensiv fluoreszierendes Substrat umsetzt, das in der Lage ist, einen Röntgenfilm zu schwärzen. Nach der einstündigen Inkubation wurde die Membran 3mal 5 min mit PBS-Puffer, 3mal 5 min mit PBST-Puffer und erneut 3mal 5min mit PBS-Puffer gewaschen. Die Detektion des *his-tag*-Protein-Antikörperkomplexes erfolgte mit dem 'ECL-Kit', der nach Angaben des Herstellers angewandt wurde. Das Substrat Luminol wird hierbei durch die Aktivität der Peroxidase unter Lichtemission zu 3-Aminophtalat oxidiert.

#### **PBS-Puffer**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,43	g		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	15,13	g		
NaCl	5,84	g		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>		<b>pH 7,4</b>

#### **PBST-Puffer**

Tween20	50	mg	0,05	% (w/v)
<b>PBS</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		

### **2.23 Gelretardationsexperimente**

Mit Gelretardationsexperimenten können sequenzspezifische DNA-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Dabei macht man sich zunutze, daß in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (2.17.2) die Mobilität eines DNA-Protein-Komplexes im Gegensatz zu freier DNA deutlich herabgesetzt ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei hauptsächlich von der Größe und der Ladung eines Proteins und nur zu einem geringen Maß von der Größe des DNA-Fragments abhängig.

### **2.23.1 Gelretardationsexperimente am 'LI-COR®-Sequencer'**

Für Gelretardationsexperimente am 'LI-COR® Sequencer' wurden als Sonde PCR-amplifizierte DNA-Fragmente eingesetzt, die durch die Verwendung von IRD800-markierten Oligonukleotiden im automatischen Sequenzierer 'LI-COR®' detektierbar waren. In Vorversuchen wurden die Qualität und Quantität der Sonden überprüft und eine geeignete Verdünnung für die DNA-Protein-Bindungsreaktion ermittelt. Die markierten Sonden, unverdünnt und verdünnt, wurden bei -20 °C dunkel gelagert.

Eine typische Bindungsreaktion erfolgte in einem 5- $\mu$ l-Ansatz folgender Zusammensetzung:

- 0,5  $\mu$ l Bindungspuffer (10x)
- 0,5  $\mu$ l Glycerin
- 0,5  $\mu$ l DTT (10 mM)
- 0,5  $\mu$ l Poly[d(I-C)] (2 mg/ml)
- 0,5  $\mu$ l DNA-Sonde
- 2,5  $\mu$ l Protein in Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)

Das Protein wurde zuletzt zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und 30 min bei RT inkubiert. 1  $\mu$ l des Ansatzes wurde auf einem 5 %igen (w/v) nativen Polyacrylamidgel (2.17.2) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5x TBE-Puffer bei 500 V und 30 °C und war nach 2-3 h abgeschlossen.

#### **Bindungspuffer (10x)**

Tris	6,06	g	500	mM
KCl	3,73	g	500	mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,02	g	50	mM
EDTA	0,29	g	10	mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 100</b>	<b>ml</b>		<b>pH 7,4-8</b>

Der Bindungspuffer wurde in 1-ml-Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde dem Puffer BSA (0,1 %) zugesetzt.

### **2.23.2 Nicht-radioaktive Gelretardationsexperimente**

Nicht-radioaktive Gelretardationsexperimente wurden mit unmarkierten Sonden im nativen 8 %igen (w/v) Polyacrylamidgel (2.17.2) durchgeführt. Die Herstellung der Sonden erfolgte über eine Standard-PCR (2.8.1) und die Analyse der Protein-DNA-Interaktion über eine Färbung des Gels im Ethidiumbromidbad und

anschließende Betrachtung des Gels unter UV-Licht. Mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage wurde das Gel photographiert und das Bild digitalisiert.

### **2.23.3 Radioaktive Gelretardationsexperimente**

Für radioaktive Gelretardationsexperimente wurden [<sup>32</sup>γ]ATP-markierte Sonden eingesetzt. Die Herstellung der zunächst unmarkierten Sonden erfolgte über eine Standard-PCR (2.8.1). Daran schloß sich die Markierung der Sonde in Form des Austauschs des 5'-Phosphatrests (2.7.4) an. Die Menge an Sonde, die für eine Bindungsreaktion eingesetzt wurde, orientierte sich daran, daß eine Aktivität von ca. 12-14000 cpm notwendig waren, um die markierte Sonde auf einem Röntgenfilm sichtbar zu machen. Eine typische Bindungsreaktion erfolgte in einem 20-µl-Ansatz und wies folgende Zusammensetzung auf:

2 µl Bindungspuffer (10x) (2.)  
 6 µl Glycerin (30 %)  
 2 µl DTT (10 mM)  
 1 µl Poly[d(I-C)] (2 mg/ml)  
 x µl DNA-Sonde  
 x µl Protein in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)

Die radioaktiv markierte Sonde wurde zuletzt zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und 15 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 µl 10x Ladepuffer versetzt und in einem 8 %igen nativen Polyacrylamidgel bei 150 V für ca. 2 h elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst, auf ein 'Whatman'-Papier (Whatman International Ltd.; Maidstone, England) gelegt und mit Haushaltsfolie bedeckt. Unter Vakuum wurde das Gel 30 min bei 65 °C getrocknet und in eine Exponier-kassette gelegt. In Abhängigkeit von der Stärke des Signals wurde für 2-12 h an einer 'BAS-MP Phosphor Imaging'-Platte autoradiographiert. Mit Hilfe des 'Bio Imager Fujix BAS 1000' und des Programms Mac Bas 1000 Image Reader wurden die Signale digitalisiert und mit dem Mac BAS V 2.31-Programm ausgewertet.

#### **Ladepuffer (10x)**

Bromphenolblau	25 mg	0,05 %
Xylenxyanol	25 mg	0,05 %
Glycerin	15 g	30 %
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 50 ml</b>	

## 2.24 Hefe-Ein-Hybrid-System (*yeast one-hybrid system*)

Mit dem Hefe Ein-Hybrid-System von MATCHMAKER von der Firma CLONTECH Laboratories GmbH (Heidelberg) können schnell und effizient Protein-DNA-Interaktionen untersucht werden. Die Methode wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (MATCHMAKER One-Hybrid System, *User Manual* und *Yeast Protocols Handbook*). Im folgenden sind nur zwei wichtige Methoden beschrieben. Weitere Methoden zu Stammhaltung (2.2.4), Anzucht (2.2.5) und Transformation (2.9.4) der Hefezellen sind an entsprechender Stelle aufgeführt.

### 2.24.1 Nachweis und Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

#### 2.24.1.1 *Colony-lift filter assay* (Breedon und Nasmyth, 1985)

Der *colony-lift filter assay* wurde mit frischen Hefekolonien, gewachsen nach einer Transformation, durchgeführt. Ein runder Papierfilter wurde in einer Petrischale mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkt. Ein weiterer Filter gleicher Größe wurde auf die Agarplatte mit den Kolonien gelegt. Dort wurde er so lange belassen, bis er gut befeuchtet war. Der Filter wurde vorsichtig abgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, wobei darauf zu achten war, daß die Seite, auf der die Kolonien abgedrückt waren, nach oben zeigte. Anschließend wurde der Filter bei RT aufgetaut. Der Wechsel von Einfrieren und Auftauen sollte die auf dem Filter haftenden Zellen permeabilisieren. Dieser Filter wurde anschließend in einer Petrischale luftblasenfrei auf den mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten Filter gelegt und so lange bei RT oder 30 °C inkubiert, bis eine Blaufärbung bedingt durch die Aktivität der freigesetzten  $\beta$ -Galactosidase zu erkennen war. Die Identifizierung positiver Klone erfolgte durch den Vergleich des Filterpapierabklatsches mit den Resten der Klone auf der Agarplatte. Die Reste der als positiv identifizierten Klone auf der Platte wurden in entsprechendem Flüssigmedium angeimpft und angezogen.

#### **Z-Puffer**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	8,05	g	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	5,5	g	
KCl	0,75	g	
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,246	g	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 1000</b>	<b>ml</b>	<b>pH 7</b>

**X-Gal-(5-Brom-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid)-Stammlösung**

20 mg/ml (DMF, N, N-Dimethylformamid)

**Z-Puffer/X-Gal-Lösung (frisch)**

Z-Puffer	100	ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	270	$\mu$ l
X-Gal-Stammlösung	1,67	ml

**2.24.1.2 Quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Galactodidase-Aktivität**

Zur quantitativen Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wurden die Hefestämme, deren  $\beta$ -Galaktoidase-Aktivität bestimmt werden sollte, in 50 ml entsprechendem Medium angezogen und bei Erreichen der exponentiellen Phase durch Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden in 700-800  $\mu$ l Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe des RiboLysers aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (14000 Upm, 30 min, 4 °C) wurde der gewonnene Rohextrakt direkt für die Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität eingesetzt. Dazu wurde 1 ml Rohextrakt mit 200  $\mu$ l o-NPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) versetzt, gemischt und so lange inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung zu erkennen war. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (1 M) gestoppt. Nach kurzer Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, RT) wurde die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 420 nm im Photometer bestimmt. Zur Berechnung der *Miller Units* einer Probe galt folgende Formel:

$$\text{Miller Units} = (E_{420} / t \times v \text{ OD}_{600}) \times 1000$$

mit t: Reaktionszeit bis zur Gelbfärbung [min]

v: eingesetztes Kulturvolumen

E<sub>420</sub>: Extinktion des Meßansatzes bei 420 nm

OD<sub>600</sub>: Optische Dichte bei 600 nm

**o-NPG-Lösung (frisch)**

o-NPG	40	mg
Phosphatpuffer (1 M, pH 7)	10	ml

## 2.25 Sequenzanalysen und Internetrecherchen

Die Analyse von Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme DNASTrider 1.2, Omega 2.0, Clone Manager 7 und Enhance Map Draw. Internetrecherchen für Sequenzabgleiche, Datenbankvergleiche, Protein- und DNA-Strukturen wurden auf folgenden Internetseiten vorgenommen:

InterPro

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

<http://www.genome.jp/kegg/>

NCBI-Hompage

<http://ncbi.nlm.nih.gov/>

NPS@Protein Sequence@nalysisat IBCP, France

[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automot.pl?page=/NPSA/npsa\\_server.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automot.pl?page=/NPSA/npsa_server.html)

Pfam (Proteinfamilien und HMMs)

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>

Swiss-Prot/EMBL

<http://us.expasy.org/sprot/>

## 2.26 Chemikalien, Gase, Enzyme, spezielle Produkte und Geräte

### 2.26.1 Chemikalien und Gase

Wenn nicht anders aufgeführt wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten **Chemikalien** von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg

Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe

Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz

Invitrogen GmbH; Karlsruhe

Otto Nordwald GmbH; Hamburg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

Die verwendeten **Gase** wurden von der Firma MIT Industriegase AG (Elchingen) geliefert.

### **2.26.2 Spezielle Chemikalien, Enzyme und Produkte**

Spezielle **Chemikalien, Enzyme** und **Produkte**, die nicht im Text erwähnt wurden, sind nachfolgend aufgelistet:

#### **Abott GmbH; Wiesbaden**

Clarithromycin

#### **Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg**

'Ready To Go™ PCR Beads'; 'Ready To Go™ RT-PCR Beads'; 'PD10'-Säulen; 'MicroSpin™ G-25 Columns'; 'GFX™ Micro Plasmid Prep. Kit'

#### **Appligene Oncor; Heidelberg**

'AquaPhenol™'; 'ReadyRed™'

#### **Biomers.net GmbH; Ulm:**

Oligodesoxynukleotide

#### **Bio-Rad Laboratories GmbH; München**

Bradfordreagenz

#### **Biomol Feinchemikalien GmbH; Hamburg**

Lysozym

#### **Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe**

IPTG; 'Roti®-Phenol'

#### **CLONTECH Laboratories GmbH; Heidelberg**

'MATCHMAKER One-Hybrid System'

#### **DYNAL A.S.; Oslo Norwegen**

'Dynabeads® M-280 Streptavidin'; 'DYNAL MPC-E'-Konzentrator

#### **Epicentre Technologies Corp. ; Madison, USA**

'EXEL™ Long Read™ Sequencing Kit-LC'

**Invitrogen GmbH; Karlsruhe**

Agarose; Oligodesoxynukleotide; TEMED

**Macherey-Nagel GmbH & Co KG; Düren**

'NucleoSpin Extract Kit'

**MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot**

dNTP; 'High Fidelity'-*Taq*-DNA-Polymerase (5 U/μl); Restriktionsendonukleasen; *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP); T4-DNA-Ligase (1 U/μl), T4-Polynukleotidkinase (10 U/μl)

**Millipore GmbH; Schwalbach**

'Microcon<sup>®</sup> YM-30'-Mikrokonzentratoren; 'Microcon<sup>®</sup> YM-100'-Mikrokonzentratoren

**MWG Biotech AG; Ebersberg**

Oligodesoxynukleotide

**National Diagnostics; Hull, England**

'SequGel XR'; 'SequGel XR'-Pufferlösung

**New England Biolabs GmbH; Schwalbach**

Restriktionsendonukleasen

**NOVEX Electrophoresis GmbH; Frankfurt, Main**

'Colloidal Blue Coomassie<sup>™</sup> Staining Kit'

**Qiagen GmbH; Hilden**

Ni-NTA-Agarose; 'QIAquick PCR purification Kit'; 'RNeasy Mini Kit'

**Roche Diagnostics GmbH; Mannheim**

ATP; Ampicillin; Kanamycin; Proteinase K; Rifampicin

**Sartorius AG; Göttingen**

Sterilfilter (Porengröße 0,2 μm)

**Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg**

Chloramphenicol

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen**

Erythromycin; Tetracyclin-Hydrochlorid; Kanamycin

**USB Corporation; Cleveland, Ohio, USA, vertrieben durch Amersham Biosciences Europe GmbH***Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)***2.26.3 Geräte**Experimentell relevante **Geräte** sind im Folgenden aufgelistet:

<b>Einmalküvetten (1/2 Mikro; 1,6 ml)</b>	VWR International GmbH; Darmstadt
<b>Elektroporationsgerät (Gene Pulser® II)</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
<b>Elektroporationsküvetten (2/4 mm)</b>	Biozym Scientific GmbH; Oldendorf
<b>'FRENCH® Pressure Cell' / -Press'</b>	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik; Schwäbisch Gmünd
<b>Gaschromatograph (CP9001)</b>	Chrompack GmbH; Frankfurt
<b>Mikroskop</b>	Axioskop, Carl Zeiss AG; Oberkochen
<b>'Multiphor II Elektro- phoreseeinheit mit Novoblot Electro- phoresis Transfer Unit'</b>	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg
<b>PCR-Maschine</b>	<b>PTC-200® Peltier Thermal Cycler:</b> Bio-Rad Laboratories GmbH; München <b>Techne:</b> Labtech International; Burkhardtshausen

---

<b>pH-Meßgerät (WTW pH 521)</b>	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten; Weilheim
<b>Phosphoimager FUJIX BAS 1000</b>	Raytest GmbH; Staubenhardt
<b>Plattenaparatur für Polyacrylamidgele</b>	Biometra biomedizinische Analytik GmbH; Göttingen
<b>Reinstwasseranlage (Elgastat Maxima)</b>	USF Deutschland GmbH; Ransbach-Baumbach
<b>'RiboLyser'</b>	Hybaid GmbH; Heidelberg
<b>'LI-COR<sup>®</sup> 4000L-Sequencer'</b>	MWG Biotech AG; Ebersberg (Vertreiber)
<b>Spektralphotometer (Ultrospec<sup>®</sup> 3000)</b>	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg
<b>Tischzentrifuge (miniSpin)</b>	Eppendorf AG; Hamburg
<b>Ultrazentrifuge (L8-60M)</b>	Beckman Coulter GmbH; Krefeld

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Regulation des *adc*-Gens

Die entscheidenden Transkriptionseinheiten der Lösungsmittelbildung in *C. acetobutylicum* stellen das *sol*- und das *adc*-Operon (**Abb. 4**) dar. Im polycistronischen *sol*-Operon befinden sich unter anderem die Gene *ctfA* und *ctfB*, welche für die beiden Untereinheiten der Acetacetyl-CoA: Acetat/Butyrat: CoA-Transferase (CoA-Transferase) codieren. Durch die Aktivität der CoA-Transferase wird im ersten Schritt der Acetonbildung Acetacetyl-CoA zu Acetacetat umgesetzt. Das monocistronische *adc*-Operon codiert für die Acetacetat-Decarboxylase (Adc), die den zweiten und letzten Schritt der Acetonbildung, die Decarboxylierung des Acetacetats, katalysiert. Beide Enzyme, Adc und Ctf, wurden schon sehr früh gereinigt und charakterisiert (Adc, Westerheimer, 1969; Fridovich, 1972; Ctf, Wiesenborn et al., 1989), und die entsprechenden Gene gehörten zu den ersten, direkt an der Lösungsmittelbildung beteiligten, Genen, die kloniert und sequenziert wurden (*adc*, Gerischer und Dürre 1990; *ctf*, Cary et al., 1990). Auf den ersten Blick scheint es unverständlich, daß die Gene der beiden für die Acetonbildung essentiellen Enzyme auf zwei verschiedenen Operonen lokalisiert sind. Ein zweiter Blick zeigt jedoch, daß beim Eintritt in die Lösungsmittelbildung hohe Konzentrationen an Säuren durch die Aktivität der CoA-Transferase hauptsächlich in Butyryl-CoA umgewandelt werden. Dieses wiederum wird durch die Aktivität der AdhE zu Butanol umgesetzt. Es macht demnach Sinn, daß die entsprechenden Gene in einem Operon organisiert sind (*sol*-Operon). Die Adc wird nur dafür benötigt, das Endprodukt der CoA-Transferase Reaktion, nämlich Acetacetat, zu beseitigen, da diese Reaktion thermodynamisch ungünstig ist. In Bezug auf die Bildung der Lösungsmittel bedeutet das, daß je nach verwendetem Substrat bis zu 50fach mehr Butanol als Aceton gebildet werden können (Bahl et al., 1986). Für die genannten Enzyme, Adc, CtfA/B, AdhE und auch für die BdhA konnte gezeigt werden, daß die entsprechenden Gene beim Übergang zur Lösungsmittelbildung auf transkriptioneller Ebene induziert werden (Fischer, 1993, Walter et al., 1992; Gerischer und Dürre, 1992). Die Promotoren aller an der Lösungsmittelbildung beteiligten Gene weisen eine starke Homologie zur Erkennungssequenz des vegetativen Sigmafaktors auf (zur Übersicht siehe Dürre et al., 1995), so daß bereits sehr früh klar war, daß nicht alternative Sigmafaktoren, sondern vielmehr regulatorisch wirksame Proteine an der Regulation der Gene der Solventogenese beteiligt sein müssen.

Für das *adc*-Gen konnte die Beteiligung des globalen Transkriptionsfaktors Spo0A an der Regulation gezeigt werden (Ravagnani et al., 2000; Böhlinger 2002). Die Experimente ergaben jedoch auch, daß Spo0A nicht allein für die Regulation ver-

antwortlich sein kann. Reporterstudien von Böhringer (2002) mit dem Promoterbereich des *adc*-Operons und dem *lacZ*-Gen aus dem thermophilen Bakterium *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, beide kloniert in ein *shuttle*-Plasmid (pIMP1) zur Replikation in *E. coli* und *C. acetobutylicum*, zeigten, daß eine Deletion von 32 Bp im Bereich des *adc*-Promoters (siehe **Abb. 6**) zu einer Verminderung der maximalen  $\beta$ -Galactosidase Aktivität von 12,6 U/mg Protein auf 2,4 U/mg Protein führte. Es lag damit die Vermutung nahe, daß dieser Bereich die Binderegion eines Proteins oder mehrerer Proteine sein könnte, die regulatorisch auf die Transkription des *adc*-Gens Einfluß nehmen.

### **3.1.1 Isolierung und computergestützte Charakterisierung von potentiellen Transkriptionsregulatoren des *adc*-Gens**

Alle oben dargestellten Experimente weisen darauf hin, daß neben Spo0A mindestens ein weiteres Protein an der transkriptionellen Regulation des *adc*-Operons beteiligt sein muß. Die Isolierung eines solchen Proteins war das Ziel der folgenden Experimente.

#### **3.1.1.1 Isolierung von an die Promoterregion des *adc*-Gens bindenden Proteinen**

Für die Isolierung von möglichen Transkriptionsregulatoren des *adc*-Operons wurden Fragmente des *adc*-Promoterbereichs mittels Standard-PCR amplifiziert und mit Hilfe eines modifizierten Oligonukleotids am 5'-Ende biotinyliert. Diese Modifikation erlaubte die Kopplung der DNA-Fragmente an mit Streptavidin überzogene Magnetpartikel ('Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin', *Beads*). Hierbei handelt es sich um suspendierte paramagnetische Partikel von einheitlicher Größe, die Streptavidin kovalent auf ihrer Oberfläche gebunden haben. Streptavidin ist ein Protein, bestehend aus vier identischen Untereinheiten, die jede für sich eine starke Bindungsstelle für Biotin besitzen. Sollen diese *Beads* für die Isolierung DNA-bindender Proteine eingesetzt werden, so gilt folgendes Prinzip (**Abb. 7**): Die mit den entsprechenden DNA-Fragmenten gekoppelten *Beads* werden mit Proteinrohextrakt inkubiert. Proteine, welche an die gekoppelte DNA-Sequenz binden, bleiben beim Waschen der *Beads* haften, während nicht-gebundene Proteine abgetrennt werden können. Die gebundenen Proteine werden anschließend eluiert und mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels analysiert.

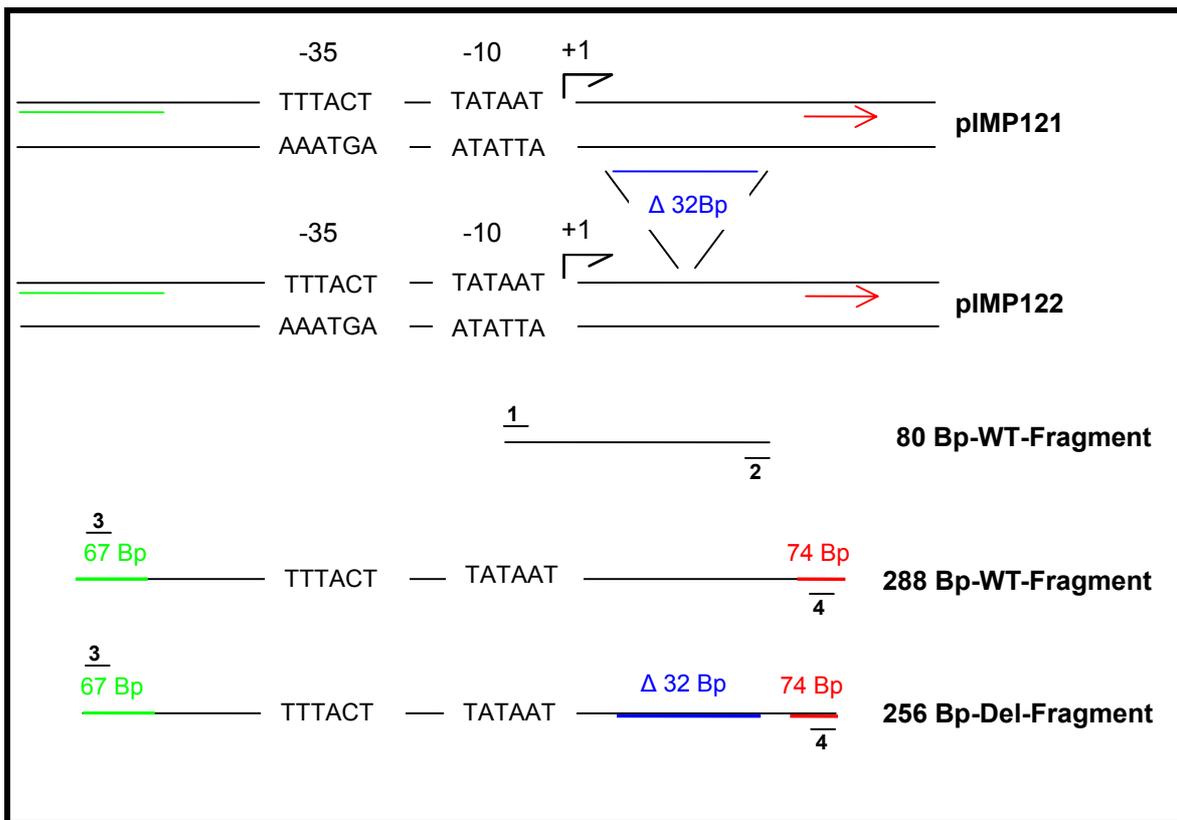


Abb. 6 Schematische Darstellung der Fragmente des *adc*-Promoterbereichs

→ *lacZ* Gen; — Vektor-DNA; WT: Wildtyp; —, Δ, Del: Deletion; — Primer, 1: *adc*intdownbiot, 2: *adc*intupsma, 3: *adc*intlangbiot, 4: IMP1

Für die Separation von Proteinen, die an den *adc*-Promoterbereich binden, wurden verschiedene DNA-Fragmente hergestellt (Abb. 6). Die *Primer* *adc*intupsma und *adc*intdownbiot erlaubten die Amplifikation eines 80-Bp-Fragments stromabwärts des Transkriptionsstarts des *adc*-Gens. Die *Primer* *adclangbiot* und IMP1 wurden für die Herstellung von zwei verschiedenen *adc*-Promoterbereich-Fragmenten eingesetzt. Bei der Verwendung des Plasmids pIMP121 als Matrize erhielt man ein 288 Bp großes Fragment, bei der Verwendung des Plasmids pIMP122 als Matrize wurde ein 256 Bp großes Fragment erhalten. Beide Fragmente unterschieden sich in der, in Abb. 6 dargestellten, Deletion von 32 Bp. Der *Primer* *adclangbiot* hybridisierte im *lacZ*-Gen des jeweiligen Plasmids und der *Primer* IMP1 hybridisierte mit der Plasmid-DNA. Überschüssige Oligonukleotide wurden durch die Verwendung von 'Microcon® YM-100' Mikrokonzentratoren abgetrennt. Dies war notwendig, um zu verhindern, daß freie biotinylierte Oligonukleotide die Bindestellen der Streptavidin-Magnet-Partikel besetzten. Die Bindekapazität der Streptavidin-Magnet-

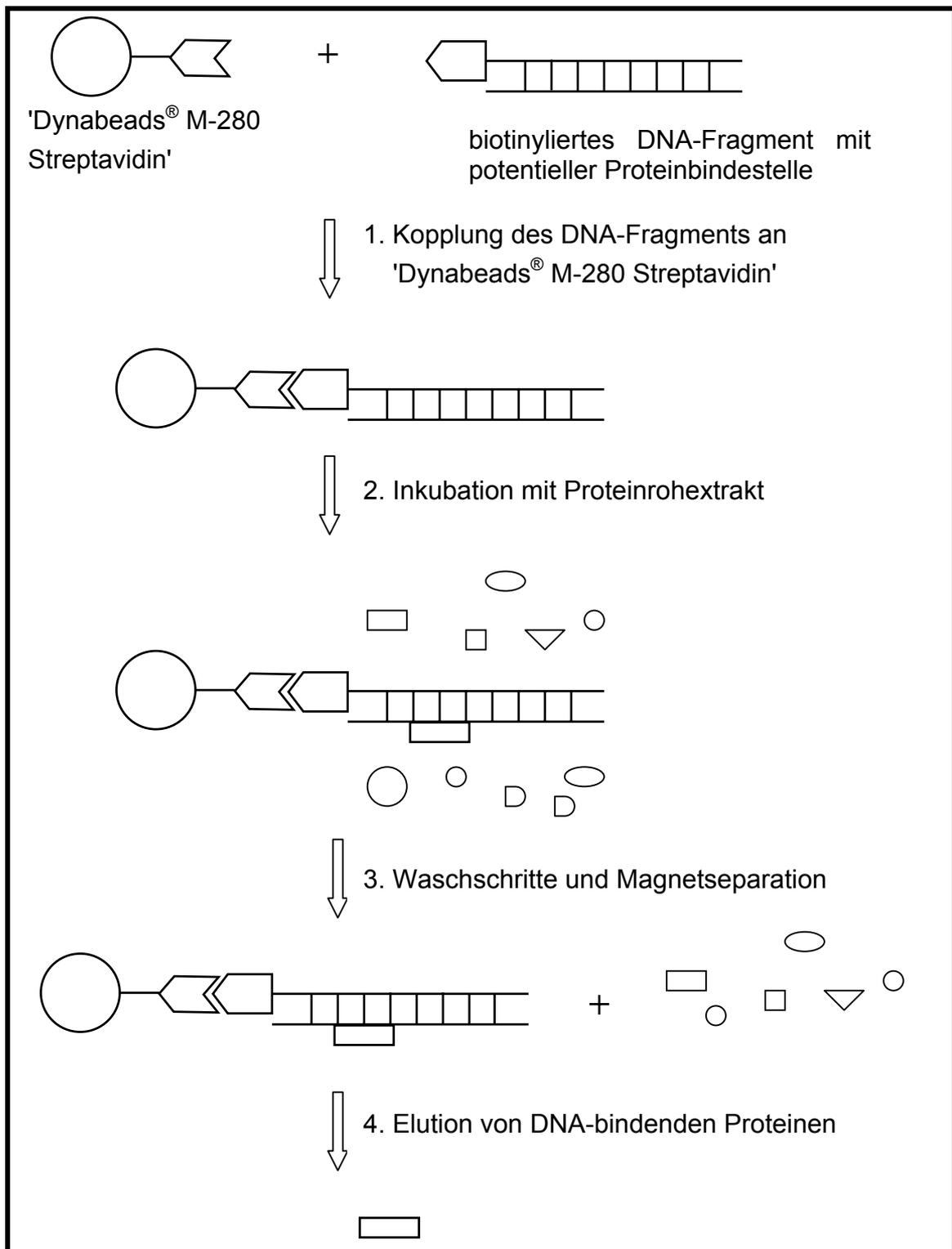
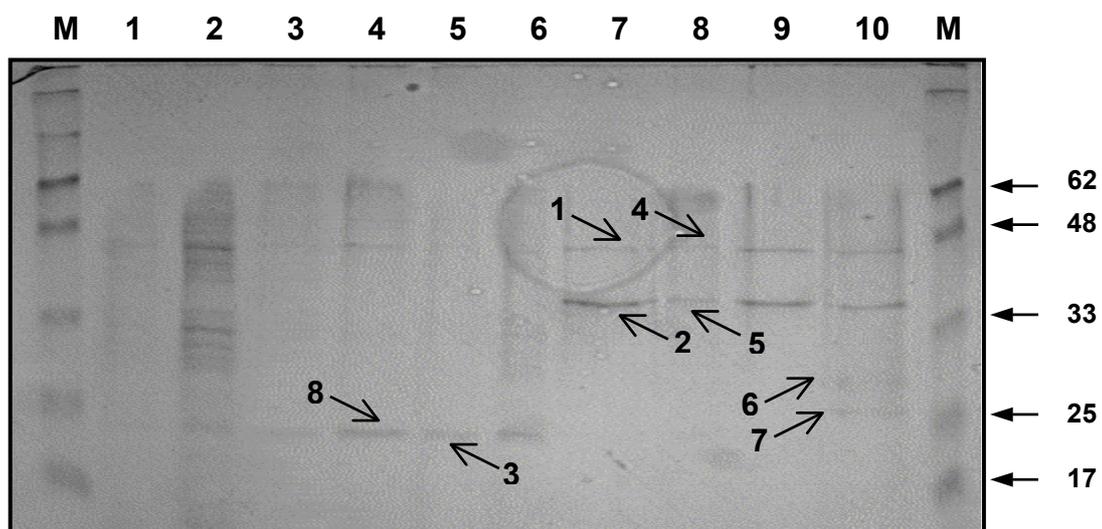


Abb. 7 Schematische Darstellung des Prinzips der DNA-Affinitätschromatographie mit 'Dynabeads® M-280 Streptavidin'

Partikel beträgt 50-100 pmol DNA/100 µl Streptavidin-Magnet-Partikel. Die Zellen für die Gewinnung des Proteinrohextrakts wurden aus einer kontinuierlichen Kultur von *C. acetobutylicum* (zur Verfügung gestellt von Michael Böhringer) gewonnen. Zellen aus der säurebildenden Phase und der Lösungsmittelbildenden Phase, erhalten aus jeweils mind. 1 l Kultur, wurden durch Verwendung der 'French<sup>®</sup> Press' aufgeschlossen und ultrazentrifugiert. Die auf diesem Weg erhaltenen Rohextrakte wurden separat mit den DNA-gekoppelten *Beads* inkubiert und Proteine, die in der Lage waren, an die DNA-Fragmente zu binden, wurden mit NaCl-Puffer in den Konzentrationen 200, 300, 400, 500 mM und 1 M eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgte über ein SDS-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit colloidalem Coomassie gefärbt und Proteinbanden von Interesse wurden aus dem Gel ausgeschnitten. **Abb. 8** zeigt die Analyse der Eluate, gewonnen mit Hilfe der Plasmid-Fragmente (288 Bp-WT-Fragment, 256 Bp-Del-Fragment, **Abb. 6**). Mit dem 80 Bp großen WT-Fragment konnten keine Ergebnisse erzielt werden. Acht Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, sechs davon konnten mit Hilfe von MALDI-TOF und Datenbankvergleichen (durchgeführt von Steffen Schaffer im Forschungszentrum Jülich) identifiziert werden.

Unter *matrix assisted laser-desorption ionization* (MALDI) versteht man die Bestrahlung einer in eine Matrix (z. B. UV-absorbierende kristalline Substanz) eingebetteten Probe durch einen UV- oder Infrarot-Laserpuls im Hochvakuum. Zur Bestimmung unbekannter Proteine werden diese gewöhnlich tryptisch verdaut und



**Abb. 8 DNA-bindende Proteinen aufgereinigt über DNA-Affinitätschromatographie (SDS-PAGE, 8 % (w/v), Färbung mit colloidalem Coomassie)**

Spur 1, 2: Eluat 200 mM NaCl, Spur 3, 4: 300 mM NaCl, Spur 5, 6: 400 mM NaCl, Spur 7, 8: 500 mM NaCl, Spur 9, 10: 1 M NaCl, M: Proteinmarker [kDa]; gerade Spurenummern: Proteine gebunden an 288-Bp-WT-Fragment; ungerade Spurenummern: Proteine gebunden an 256-Bp-Del-Fragment

in die Matrix eingebettet. Durch den Laserpuls werden explosionsartig Teile der Matrix zusammen mit den eingebauten, positiv geladenen Peptidionen freigesetzt, die dann in einem starken elektrischen Feld beschleunigt werden und schließlich nach einer bestimmten Flugstrecke auf einen Detektor treffen. Die Dauer der Flugzeit eines Ions bis zum Auftreffen auf den Detektor ist abhängig von seiner Masse. Zur Identifizierung des unbekanntes Proteins werden die Flugzeiten gemessen (TOF: *time of flight*) und die somit indirekt erhaltene Masse der Peptidfragmente mit einer Datenbank verglichen.

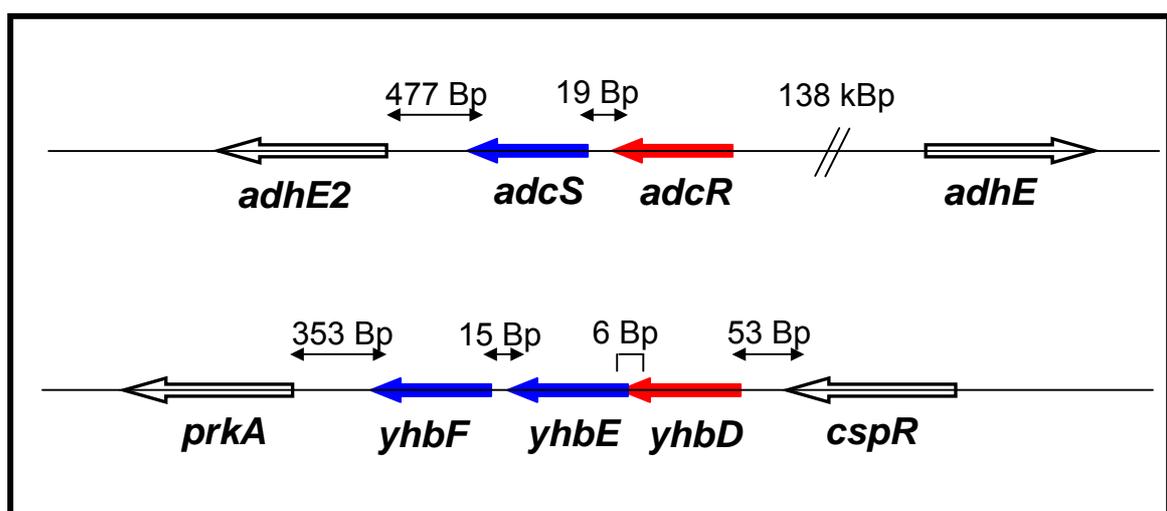
Bei den Proteinbanden 1 und 4 (**Abb. 8**) handelte es sich jeweils um die große Untereinheit der Exonuklease VII aus *C. acetobutylicum* (45 kDa), und die Banden 2 und 5 (**Abb. 8**) konnten jeweils dem DNA-Replikationsprotein DnaD aus *C. acetobutylicum* (38 kDa) zugeordnet werden. Für die Banden 3 und 8 (**Abb. 8**) ergab die Identifikation, daß es sich jeweils um ein bisher nicht charakterisiertes Protein aus *C. acetobutylicum* handelte und zwar in beiden Fällen um ein Ortholog des YhbD-Proteins aus *Bacillus subtilis*. Da es sich bei dem DnaD-Protein und dem Exonuklease-Protein um typische DNA-bindende Proteine handelte, wurden sie keinen weiteren Untersuchungen unterzogen. Das nicht charakterisierte Protein aus *C. acetobutylicum* erhielt die Bezeichnung AdcR (adc Regulator) und war Gegenstand weiterer Experimente.

### 3.1.1.2 Computergestützte Analyse des Proteins AdcR

Das AdcR-Protein codierende Gen *cap0037*, im Weiteren *adcR*, befindet sich auf dem pSOL1-Megaplasmid. Das Gen hat eine Länge von 629 Bp. Die genetische Organisation ist schematisch in **Abb. 9** dargestellt. Das Gen bildet ein Operon (3.1.2) mit dem stromabwärts liegenden Gen *cap0036* (728 Bp), im Weiteren *adcS*, und befindet sich in direkter Nähe des *adhE2*-Gens. Letztgenanntes Gen codiert, wie das *adhE*-Gen, für eine bifunktionelle Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase E und ist ebenfalls auf dem Megaplasmid lokalisiert. Das *adhE2*-Gen ist monocistronisch organisiert und spielt in der normalen Aceton-/Butanol-Produktion keine Rolle. Natürlicherweise wird es durch die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose und Glycerin (Vasconcelos et al., 1994) im Medium induziert. Es tritt dann die sog. alkohologene Fermentation (Girbal und Soucaille, 1998) ein, d. h., es werden nur die Lösungsmittel Butanol und Ethanol, nicht aber Aceton, gebildet. Künstlich kann diese Fermentation durch die Zugabe von Methylviologen zu einer wachsenden Kultur ausgelöst werden (Rao und Muttharasan, 1986; 1987). Über die Regulation dieses Gens ist noch nichts bekannt. 34 Bp stromaufwärts des Startcodons von *adcR* läßt sich eine potentielle reverse Spo0A-Bindestelle (0A-Box) identifizieren. Das *adcR*-Gen findet sein Ortholog im *B. subtilis yhbD*-Gen

(713 Bp). Die Sequenzidentität der Gene liegt bei 41% (**Abb. 10**). Für das *adcS*-Gen lassen sich in *B. subtilis* zwei Orthologe finden, wobei es sich um die Gene *yhbE* (710 Bp) und *yhbF* (704 Bp) handelt. Die jeweilige Sequenzidentität liegt im Falle von *yhbE* bei 50 % und im Falle von *yhbF* bei 35 % (**Abb. 11 und 12**). Die Anordnung der Gene in *B. subtilis* ist in **Abb. 9** schematisch dargestellt. Das Gen *yhbD* überlappt mit dem Gen *yhbE* um 6 Bp und zwischen den Genen *yhbE* und *yhbF* liegen 15 Bp (Lederle, 2005). Stromaufwärts des *yhbD*-Gens liegt das Gen *cspR*, das für eine rRNA-Methylase codiert, und stromabwärts des *yhbF*-Gens befindet sich das Gen einer Serin-Protein-Kinase, *prkA*.

Computergestützte Analysen ergaben für das AdcR-Protein (25 kDa) zwei herausragende Domänen. Im N-terminalen Bereich des Proteins (Position 7-81, **Abb. 13**) befindet sich eine DNA-bindende Domäne in Form eines *helix-turn-helix*-Motivs, weiter C-terminal (Position 162-184, **Abb. 13**) läßt sich eine transmembrane Domäne vermuten. Auch das Protein YhbD weist N-terminal ein *helix-turn-helix*-Motiv auf (**Abb. 13**). In beiden Fällen handelt es sich um das HTH\_MERR Motiv (*helix-turn-helix, mercury resistance*), durch das die Proteine AdcR und YhbD der MerR-Proteinfamilie zugeordnet werden können. Das MerR-Protein, das in vielen Bakterien zu finden ist, vermittelt die Quecksilber-abhängige Induktion der Gene, die eine Resistenz gegenüber Quecksilber vermitteln. In Abwesenheit von Quecksilber reprimiert MerR als Dimer die Transkription, indem es eine starke Bindung mit der MerR-Bindestelle eingeht. In Anwesenheit von Quecksilber bindet das Dimer ein einzelnes Ion und wird, ohne sich von der MerR-Bindestelle zu lösen, zu einem aktiven Transkriptionsaktivator. Zu dieser Familie gehören auch die Trans-



**Abb. 9** Schematische Organisation der Gene *adcR* und *adcS* und deren Orthologe *yhbD*, *yhbE* und *yhbF* (Größenordnungen nicht maßstabsgetreu)

```

adcR      -----
yhbD      1 atgctttgtttcgtttttgggcttaacaacgtaacagtgttatgttacia

adcR      1 -----atggatgaaactaatttaatttcta
yhbD      51 tgtacccatcaaaggagctggacttatggaagaac--aa-ttaatctcta

adcR      26 aaaaagaacttcttgagataactcatatcttatggtcagctgtataga
yhbD      98 aaaaagaattacttgaaagaacatcgatttcatacggtcagctgtatcga

adcR      76 tggagagaaagaaacttatacctgaggaatggttcataaagaaatccag
yhbD      148 tggagcggaaaaacttaataacctgaggaatggtttattcgtaaatccac

adcR      126 ctttactgggcaggagac-ctttttccctaaaaatgaaatcttagataga
yhbD      198 atttacagggcaagagagacttttttcc-gagagaggagattttaaacgt

adcR      175 attgaaaaaattaaagagctttaagggggatgtatcattagatgagcttgc
yhbD      247 atatcaatgattcaaaagatgaaagaaaatttgtctttggatgaaatgag

adcR      225 caatatattttcccaaatctttcagagctttctttagaaaaaaaagaaa
yhbD      297 ggaaatgctgtcgccgaaaatgaaggatgtcagcatgaccgctgatgaat

adcR      275 tgctggaacaaaacattgtttcgcaaactataatgaacttatatactagc
yhbD      347 tgcttcataaagggttggtttcaaggcctgctcttgaagcctatc-aga

adcR      325 attcatgaaaattcaaataaacttttcatttaacgaactacttttcatgac
yhbD      396 agacggaggaagtccggt--tttttcatccagcgatttgctttcgctgtt

adcR      375 tatattagataggttcctaaaatccgggaaaacaagtttagaagaaggta
yhbD      444 tgtgcttgagggcctgctgcagctctggaaatgtcagccttgcagaag---

adcR      425 aactcacttcatactcttgaagaaaatta caaaaattttgatgaccga
yhbD      491 -----caaaaat-----

adcR      475 tattgtgacgtagtattaaataagaaaactaggaatagctatatgttttct
yhbD      498 --ggctgcagaggtatt-----aaagaagca-----

adcR      525 tatgcttataccaaatgagatatattgaaaatcacag-----
yhbD      522 -----tgatactgaa-gag-----attgaaaa-acagacggagctgatt

adcR      563 -----catctcttgttctaaaa-----
yhbD      559 gtgctccgcaagctcgggtgcacaacttgttttatagcggctgcggcggga

adcR      580 -----gtaaacgctagagaatg-----
yhbD      609 cagcattttgtttgaatcatccgtaaagggttggtgaaacgggtagatttat

adcR      597 -----tttagaagaattaaaatcaaaatt-----atcac
yhbD      659 taaaagcttcagaggaattaaaacaacatttatgcaggagggccatcaa

adcR      626 tataa----
yhbD      709 tggatgtag

```

**Abb. 10** Sequenzidentitäten der Gene *adcR* und *yhbD* (übereinstimmende Basen gelb hinterlegt, Sequenzidentität 41 %)

adcS	1	atggaagaa	aaaattatcagacgt	aaaag-----	tatctggaagcggaa	
yhbE	1	atggatgta	-----	gtggaaaagctggtgata	aaatggatcaggaa	
adcS	44	gtataggtggagga	aaactatgacgaagt	aaaaattagtggctctgct	aaa	
yhbE	41	gttctaagggagga	acatttcaatcagttgagatta	aatggcagcgggaca		
adcS	94	ataaatggta	atgtaaattgcaacagttat	atgtgttcaggct	tcttctac	
yhbE	91	gtggccgggga	cgtggagtgtagacactttt	-----	tctttaa	
adcS	144	tgcta	aatggaaatatt-actgc-----	caaagagatagtt	aaaatt-tca	
yhbE	129	tgga	aacggaaaagcggacggcagcgt	caaagcgaagcggg	aaactatca	
adcS	187	g--gaa	caactaaagtacacggtgatt	taaattctggagatt	taattgta	
yhbE	179	gcggt	caggaaagatacatggagacgt	tgaagcagaatctat	ccggatg	
adcS	235	agcggctct	tcccgta	cctttggaaatg	tactgctaaaaaat	caaaat
yhbE	229	aatggc	actggttt	ta	ttcaaggagaggtatctgcaaaa	caattgaaaat
adcS	285	aagtggct	caagtgatattgaaggaaat	ggtcacactgacag	tatagata	
yhbE	279	cgctgg	atcatcaacatttggcggc	actgtcaaggctgat	ggaattgaca	
adcS	335	tatcgg	ttcagtttctataggtgag	gattgtgaaagcag-	aacatttcca	
yhbE	329	ttagc	gaaaagctgtcatggaagcag	attgtgaaacagaa	aacctttc-a	
adcS	384	tgca	agaggagccttcgagatagct	ggattatta	aatgctg-----gtga	
yhbE	378	atcaga	agggaaatgcaaaatcagcggg	cttttaaatgcag	accaggtga	
adcS	429	tattg	aaatatat	atgtatggaaaatgtagag	taaaggat	ataggtggag
yhbE	428	tcatt-	aagcttctgcagggg	aaagcta-tgcgcgggagat	cggtgcc	
adcS	479	aga	atat	aacagtaa-----	aattaggtctggacatt	ttatacatga
yhbE	476	gccat	cttcaagtgac	ctgcagaaaaggaatgct	gacattgctcagat--	
adcS	522	gatgatg	----	aaccttttcttt	acccgcggaagatt	ggtaaccagcata
yhbE	524	--tgatg	ccgcagcctgttct	-----	aacagcaga	
adcS	568	----	atcgaaggc	gataatatttatctcgagc	acacggacgc	aaaaatag
yhbE	552	gctgat	cgaaggtgac	gtgattgaattgacaaat	acaaaggcg	aaaaaccg
adcS	614	tgagagg	aaacaatattacaat	aggcccta	actgcaatattgaaaatata	
yhbE	602	tgcg	cggtaaataaagtgatcat	cgccggattg	ccagattgaaaccgtc	
adcS	664	gaata	tataaaatca	actgaatatggatcagagct	gtaaggcact	ttgcaa
yhbE	652	gaata	-----	cagcggggactata	acctgtgatccaagcgcgt	cggttg
adcS	714	aaagg	ttgatgaa	----	taa	
yhbE	695	aaacat	ccaca	aagttgtaa		

**Abb. 11** Sequenzidentitäten der Gene *adcS* und *yhbE* (übereinstimmende Basen gelb hinterlegt, Sequenzidentität 50 %)

```

adcS -----
yhbF 1 attcttgtttatgaagcgctgcccagcaaaattaccgtgatttaaata

adcS -----
yhbF 51 gtgaaaaaccgctcatcgatgatgggogggttttttgcggatgttgaa

adcS -----
yhbF 101 atgctttgtttcgtttttgggcttaacaacgtaacagtgttatgttacia

adcS 1 -----atggaagaaaatta-----
yhbF 151 tgtaccatcaaaggagctggacttatggaagacaattaatctctaaaa

adcS 16 -----tcagacgtaaaa--gtatc--tgg
yhbF 201 aagaattacttgaaagaacatcgatttcatacggtcagctgtatcgatgg

adcS 36 aagcggaa-----
yhbF 251 aagcggaaaaacttaatacctgaggaatggtttattcgtaaatccacatt

adcS 44 -----gtata-
yhbF 301 tacagggcaagagacgttttttccgagagaggagattttaaaacgtatat

adcS 49 -----ggtggaggaaactatgacgaagtaaaaattagtggct
yhbF 351 caatgattcaaaagatgaaagaaaatttgtctttggatgaaatgagggaa

adcS 86 ctgct-----aaaataaatggt-----atg-----taaattgca
yhbF 401 atgctgtcgccgaaaatgaaggatgtcagcatgacccgctgatgaattgct

adcS 116 acagttatatgtg--ttcaggctcttctactg----cta-----
yhbF 451 tcataaagggtttggtttcaaggcctgctcttgaagcctattcagaagacg

adcS 149 atgga---aatattactgccaaagagatagttaaa-----
yhbF 501 atggagacaacaaaactgggaaatttaaaattatatggcgctgggcatgc

adcS 181 -----atctcaggaacaact---aaagtaca----
yhbF 551 cgcaggaggcgcgtatcacaatgtcagcatcaaaggagaaggatagttg

adcS 204 -----cggtgatttaattctggagatttaattgtaagcggctcttc
yhbF 601 gagaagggctgtctgctgtaggctgccgcatatacggaacgggcctttt

adcS 246 c-----cgtacctttgga-aatgttactg
yhbF 651 ctcgaaaagcagagactgagcggctgctgtgctcgggaaagtgaatg

adcS 269 ctaaa-----aaaatcaaata-----
yhbF 701 -taaaggcgatctgacagccggcaaaatcaatataatgggacaatgaaa

adcS 286 ---agtggctcaagtgatattgaagga-----aatgttcacactga
yhbF 750 gtcagcggctcacttcaatttgatcgattcaatctgaaaggccagactga

adcS 324 cagtatag---atatatccggttcagtttct-----
yhbF 800 aattggcgggaatatgactgg---agaatcctgcgatgtgaaaggaagc

adcS 352 -----ataggtgaggattgtgaagcagaaatccatgcaagagga
yhbF 847 tttagcgtaataggt---gattgtgaaacagaaatgtccatgtccagggc

adcS 394 ggcttcgagatagctggattataaatgctggtgatattgaaatatatat
yhbF 894 tgtgttgatgatcggggttataaatcgggtga-gatcaagctgggat

adcS 444 gtatggaaaatgtaga----gtaaaggatataggtggagagaatataaca
yhbF 943 tgagccatgatataaacctatgtgcaggaaatcggcggaaacaacattaca

adcS 490 gtaaaattaggttctggacatttttatcatgagatgatgaacctttctt
yhbF 993 gtgaaaagacgcgcgagtttttttagccggaagaaagggaagctgat---

```

Abb. 12 Sequenzidentitäten der Gene *adcS* und *yhbF* (übereinstimmende Basen gelb hinterlegt, Sequenzidentität 35 %)

```

adcR      1 -----mdetnliskkelleithisygqlyr
yhbD     1 mlcfvfglnnvtvlcynvpikgaglmeeq-liskkellertsisygqlyr

adcR      76 wkrkklipeewfikksftggetffpkneildriekiksfkgdvsldela
yhbD    148 wkrknlipeewfirkstftggetffpreeilkrismiqlkmmkenlsldemr

adcR     226 nifspnlseleslekkemleqnivsqtimnlytsihensnnfssfnellfmt
yhbD    298 emlspkmdvsmtadelhkhglvsrpaleay-sedggsppvffssdllslf

adcR     376 ildrflksgktsleegklilhtleenyknfddrycdvvlirklgiaicfl
yhbD    445 vlegllqsgnvsllaekmaaevlkkhdteeiekqtelivlrklgvttcfi

adcR     526 mlipneyientaslvkvnarecleelkksklsl*-----
yhbD    595 aaaadsilfessvkvvervdllkaseelkttfmqeghqwm*

adcS      1 meeklsdvkvsgsgsigggnydevkisgsakingnvnncnsymcsgsstan
yhbE     1 -mdvveklvingsgsgskggtfqsveingsgtvagdvectfsfnngkad

adcS     151 gnitakeivkisgttkvhgdlnsgdlivsgsrtfgnvtakkikisgssd
yhbE    148 gsvkaka-vtisgsgkihgdveaesirmngtgfiqgevsakqlkiagsst

adcS     301 iegnvhtdsididsgsvsigedceeahfharggfeiagllnagdieiymy-
yhbE    295 fggtvkadgididsgkavmeadcetetfqsegkckisgllnadqvliklsa

adcS     448 gkcrvkdiggenitvklsghfihemnlf--ftrgrlvtsiiegdniiyl
yhbE    445 gesyareigcrhlqvtrckg----mltllrlmpqpvltaeliegdviel

adcS     592 ehtdakivrgnnitigpncnieyknqlnmdqsccka-lckkvde*
yhbE    580 tntkaktvrgnkviligpdcqietveysgdytcdpsasvetstkl*--

adcS      1 -----meeklsdvk--vsgsgsiggg-----nydevkis
yhbF     1 ilvyealrqqnryrdlk**xtrssmmggffcgcnalfrfwa*qrnsvmlq

adcS      82 gsakingnv-----ncnsymcsgsstangnit-----
yhbF    151 cthqrswttygrtinl*krit*knidfirsavsmeaekln*gmvys*ihi

adcS     163 --akeivkisgttkvh-gdl-----nsgdlivsgss-----
yhbF    301 yrardvfsergdfktyindsskderkfvfg*negnavaenegcqhdr**ia

adcS     247 -----rtfgnvtakkikisgssd----
yhbF    451 s*rfgfkacs*slfrrrwrqqnwei*nymalgmpqearitmsaskekv*1

adcS     301 -----iegnvhtdsididsg-----svsigedc
yhbF    601 ekgcll*aaayteraffsekqrlsgcvcsekvnvkai*qpaksiymgq*k

adcS     367 eaehfha----rggfeiagllna----gdie--iymygkcrvkdig
yhbF    751 saahfnlidsi*karlklagi*lenpam*kgsla**vivkqkcsmsq--

adcS     478 enitvklsgghfihemnlf-----fftrgr--
yhbF    892 ---avlmrygy*irvrsswd*ami*tmcrksaeqqqlq*kdarvflagrkg

adcS     553 -----lvtsiiegdniiylehtdakivrgnnitigpncie
yhbF   1033 s*spms*keigfiwripkrqlsgekk*ssgrdaaser-----lstntnvn

adcS     658 nieyknqlnmdqscckalckkvde*
yhbF   1168 airi-hrlkkkqnc-----

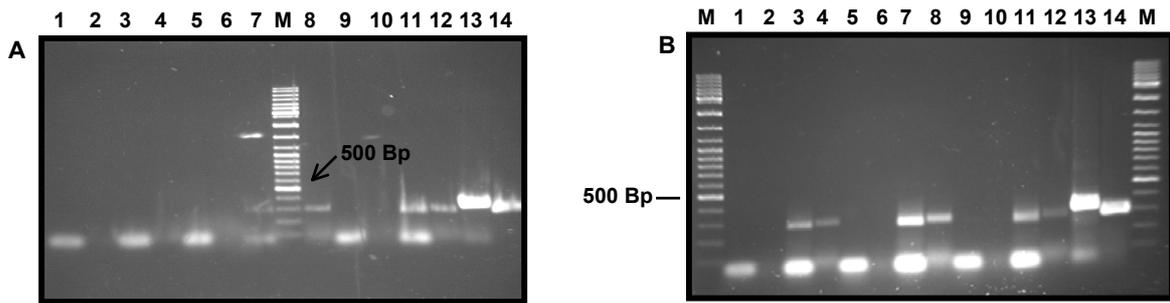
```

**Abb. 13** (vorherige Seite) Sequenzidentitäten der Proteine AdcR-YhbD (37 %), AdcS-YhbE (36 %) und AdcS-YhbF (11 %); HTH-Motiv: rot unterstrichen

kriptionsaktivatoren der sog. *multidrug-efflux transporter*, BltR und BmrR aus *Bacillus subtilis* (Ahmed et al., 1994), GlnR (Schreier et al., 1991), ein Repressor der Transkription des Glutamin-Synthase-Gens ebenfalls aus *Bacillus subtilis*, das potentielle Hitzeschockprotein HspR (Bucca et al., 1997) aus *Streptomyces coelicolor*, NolA (Sadowsky et al., 1991), ein Regulator der Knöllchenbildung in *Bradyrhizobium japonicum*, der *redox-sensing activator* SoxR (Nunoshiba et al., 1992) aus *E. coli* und tipA (Nasima et al., 2002), ein Transkriptionsaktivator des Thiostrepton-induzierbaren Promoters *ptipA* in *Streptomyces lividans*. Eine potentielle transmembrane Domäne läßt sich im YhbD-Protein nicht finden. Das Vorhandensein einer solchen Domäne im AdcR-Protein legte die Vermutung nahe, daß das Protein in der Membran verankert sein könnte (3.1.4.3). Die Sequenzidentitäten der einzelnen Proteine sind der **Abb. 13** zu entnehmen.

### 3.1.2 *adcR*-/*adcS*-Expressionsstudien

Da bislang nichts über die Gene *adcR* und *adcS* und deren Genprodukt in *C. acetobutylicum* bekannt war, galt es zunächst mit Hilfe von RT-PCR-Analysen und *Northern blot*-Experimenten Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wann die Gene in *C. acetobutylicum* transkribiert werden, und ob die Vermutung des Vorliegens einer Operonstruktur, gegeben durch den nur 19 Bp betragenden Abstand zwischen den beiden Genen, bestätigt werden konnte. Für die Durchführung beider Experimente wurde ein Wachstumsversuch mit dem Wildtyp (WT) von *C. acetobutylicum* durchgeführt. Eine statische Kultur wurde bis zum Eintreten in die stationäre Phase angezogen und es wurden zu verschiedenen Zeiten Proben für eine Gesamt-RNA-Isolierung genommen. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem 'RNeasy Mini Kit'. Die erhaltene RNA wurde einem DNase-Verdau unterzogen und die DNA-freie RNA in RT-PCR-Ansätzen eingesetzt. Hierbei handelte es sich um sog. *one-step*-Reaktionen, die mit 'Ready To Go™ RT-PCR Beads' durchgeführt wurden. Als Matrize diente zum einen RNA, zum anderen aber auch DNA, um sicherzustellen, daß die PCR-Ansatzbedingungen eine Amplifikation generell ermöglichten. Eine Kontrolle dahingehend, daß die eingesetzte RNA tatsächlich DNA-frei war, erfolgte durch die Verwendung inaktivierter 'Ready To Go™ RT-PCR Beads' mit RNA als Matrize. Eine weitere Kontrolle bezüglich des Stattfindens einer erfolgreichen RT-Reaktion war durch die Mitführung von Reaktionen auf das Gyrase A-Gen (*gyrA*) gegeben



**Abb. 14** RT-PCR-Ansätze (2 %iges Agarose Gel); A) exponentielle Phase des Wachstums, B) Übergang in die stationäre Phase des Wachstums

RNA-Matrize: Spuren 1, 2, 5, 6, 9, 10: inaktivierte 'RT-PCR Beads'; Spuren 3, 4, 7, 8, 11, 12: aktive 'RT-PCR Beads'; DNA-Matrize: Spur 13: *gyrA*; Spur 14: *adcR/adcS*-Übergang; M: Größenstandard in Bp. Wurde RNA als Matrize verwendet, so wurde in den geraden Spuren der *adcR/adcS*-Übergang, in den ungeraden Spuren das *gyrA*-Gen amplifiziert.

(Primer *gyrA*<sub>fw</sub> und *gyrA*<sub>rev</sub>). Das *gyrA*-Gen stellt ein sog. *housekeeping gene* dar. *Housekeeping genes* sind Gene, die für das Überleben der Zelle lebensnotwendig sind und daher immer, d. h. konstitutiv, exprimiert werden (MedicineNet.com). Bei erfolgreicher RT-Reaktion sollte die mRNA dieses Gens dementsprechend immer nachzuweisen sein. Um das Expressionsverhalten der Gene *adcR* und *adcS* zu untersuchen, wurden die Primer (36/37<sub>fw</sub> und 36/37<sub>rev</sub>) so gewählt, daß das 3'-Ende des *adcR*-Gens, der intergene Bereich und das 5'-Ende des *adcS*-Gens bei Vorhandensein der entsprechenden mRNA amplifiziert werden sollte.

Wie in **Abb. 14** zu sehen, waren die Kontrollen erfolgreich. Die erwarteten Produkte wurden auf DNA-Ebene erhalten, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß die gewählten PCR-Ansatzbedingungen eine Amplifikation prinzipiell ermöglichten. Das negative Ergebnis aller inaktivierten 'Ready To Go™ RT-PCR Beads' bestätigte die DNA-Freiheit aller RNA-Matrizen. Ein Amplifikat des *gyrA*-Gens wurde in allen Ansätzen mit RNA als Matrize erhalten, womit eine erfolgreiche RT-Reaktion nachgewiesen war. In Anbetracht aller durchgeführten Kontrollen konnte für die Gene *adcR* und *adcS* festgehalten werden, daß sie als Operon vorliegen und während des gesamten Wachstums exprimiert werden.

Die unter Anwendung der RT-PCR-Analysen erhaltenen Ergebnisse sollten zusätzlich in einem *Northern blot*-Experiment bestätigt werden. Weiterhin sollte ein derartiges Experiment quantitative Aussagen bezüglich der Expression der beiden Gene bzw. des Operons liefern. Quantitative Aussagen über die Expression sind im Falle der Anwendung eines *Northern blot*-Experiments eindeutiger als im Fall der RT-PCR-Analysen, da hier bei gleicher Menge eingesetzter RNA über die

Stärke des Signals auf einem Film eine Aussage über die Stärke der Expression gemacht werden kann.

Für das *Northern blot*-Experiment wurde die Gesamt-RNA über eine modifizierte Methode von Oelmüller et al. (1990) gewonnen, einem DNase-Verdau unterzogen und anschließend in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Die aufgetrennte RNA wurde daraufhin auf eine Nylonmembran übertragen und nach einer Prähybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Bei den verwendeten Sonden handelte es sich um 300-400 Bp große, über eine Standard-PCR gewonnene Fragmente aus dem internen Bereich des Gens *adcR* bzw. *adcS*, die nach erfolgreicher Amplifikation dephosphoryliert und anschließend, unter Verwendung von [<sup>32</sup>γ]ATP und der T4-Polynukleotidkinase, wieder phosphoryliert und damit radioaktiv markiert wurden. Dem Autoradiogramm der Membran konnte nur entnommen werden, daß die Markierung der Sonden und ihre Bindung an sich selbst erfolgreich waren, Erkenntnisse zur Expression der Gene *adcR* und *adcS* konnten nicht gewonnen werden.

### **3.1.3 Der Einfluß der Proteine AdcR und AdcS auf die Lösungsmittelbildung von *C. acetobutylicum***

Das Protein AdcR wurde auf Grund seiner Eigenschaft, an die *adc*-Promoterregion zu binden, isoliert. Ein möglicher regulatorischer Einfluß des Proteins auf die Expression des *adc*-Gens ist daher anzunehmen, und damit verbunden ein Einfluß des Proteins auf die Lösungsmittelbildung, speziell die Acetonproduktion. Da das AdcR-Protein codierende Gen *adcR* ein Operon mit dem stromabwärts liegenden *adcS*-Gen bildet, könnte auch das AdcS-Protein auf die Regulation des *adc*-Gens, und entsprechend auf die Bildung von Aceton, einen Einfluß haben.

#### **3.1.3.1 Modulation der Expression der Gene *adcR* und *adcS* in *C. acetobutylicum***

Da die Inaktivierung von Genen in *C. acetobutylicum* zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht ausgereift war, wurde der Einfluß der Proteine AdcR und AdcS auf die Lösungsmittelbildung durch Modulation der Expression der entsprechenden Gene untersucht. Dazu wurde ein bereits von Schaffer (1999) erfolgreich eingesetztes 'sense- und antisense-RNA-System' verwendet.

##### **3.1.3.1.1 Konstruktion von sense- und antisense-Plasmiden**

Als Ausgangsplasmid für weitere Klonierungen wurde das Plasmid pIMP1 gewählt, dessen Funktionalität in *C. acetobutylicum* zweifelsfrei gezeigt werden konnte

(Schaffer, 1999). Das Plasmid pIMP1 ist eine Fusion, bestehend aus dem *E. coli* Klonierungsvektor pUC18 und dem *B. subtilis* Plasmid pIM13 (Mermelstein et al., 1992), dessen Replikationsursprung und MLSr-Resistenzdeterminante (*ermC*) die Replikation in bzw. Clarithromycinresistenz von *C. acetobutylicum* ermöglichen. Die Kopienzahl von pIMP1 beträgt in diesem Organismus 6-8 Kopien/Zelle (Lee et al., 1993).

In **Abb. 15** sind schematisch die Plasmide pBS77-pBS83 dargestellt. Im ersten Schritt wurde der konstitutiv starke Promoter des *C. acetobutylicum* Phosphotransbutyrylase-Butyratkinase- (*ptb-buk*-) Operons mit Hilfe der Oligonukleotide KL08 und KL09 amplifiziert. Nach einem *EcoRI-NdeI*-Verdau wurde dieses 123-Bp-große Fragment in entsprechend verdautes pIMP1-Plasmid ligiert. In die *NdeI*-Schnittstelle des resultierenden Plasmids pBS77 wurde im zweiten Schritt das über eine Standard-PCR mit den Oligonukleotiden AS137NdeI und AS237NdeI amplifizierte und *NdeI*-verdaute promoterlose *adcR*-Gen (643 Bp) kloniert. Die dabei entstandenen Konstrukte wurden als pBS78 (*sense*-Orientierung von *adcR*) und pBS79 (*antisense*-Orientierung von *adcR*) bezeichnet. Die Übertragung des Plasmids pBS78 in *C. acetobutylicum* sollte zu einer starken Überexpression des *adcR*-Gens führen, die Übertragung des Plasmids pBS79 in *C. acetobutylicum* sollte zu einer Inhibition der Translation der *adcR*-mRNA führen. Die Ursache für diese Inhibition ist die Hybridisierung der *adcR*-mRNA mit der im Überschuß vorhandenen *adcR*-antisense-RNA und die daraus resultierende Blockade des Ribosomenbindungsorts. Das *adcS*-Gen wurde entsprechend in das Plasmid pBS77 kloniert (Oligonukleotide AS136NdeI und AS236NdeI). Die entstandenen Produkte trugen die Bezeichnung pBS80 (*sense*-Orientierung von *adcS*) und pBS81 (*antisense*-Orientierung von *adcS*). Auch ein Fragment, das sowohl das *adcR*- als auch das *adcS*-Gen enthielt, wurde auf die beschriebene Weise in das Plasmid pBS77 kloniert und lieferte die Konstrukte pBS82 (*sense*-Orientierung von *adcR/adcS*) und pBS83 (*antisense*-Orientierung von *adcR/adcS*). Alle Plasmide wurden erfolgreich methyliert und anschließend in eine Transformation von *C. acetobutylicum* eingesetzt.

*C. acetobutylicum* besitzt mit *Cac824I* eine Typ-II-Restriktionsendonuclease, die das Sequenzmotiv 5'-GCNGC-3' erkennt und schneidet (Mermelstein et al., 1992). Die Methylierung des internen Cytosinrests in den Basenfolgen 5'-GCNGC-3' bzw. 5'-GGCC-3' durch die Methyltransferase  $\Phi$ 3TI des *B. subtilis* Phagen  $\Phi$ 3T (Noyer-Weidner et al., 1985) führt zu einer Verhinderung der Restriktion durch *Cac824I*. Da gezeigt werden konnte, daß derart methylierte Plasmid-DNA mit einer um zwei Größenordnungen höheren Transformationseffizienz in *C. acetobutylicum* übertragen werden konnte als entsprechend nicht-methylierte Plasmid-DNA (Mermelstein und Papoutsakis, 1993), wurden alle in dieser Arbeit konstruierten Plasmide, die in *C. acetobutylicum* übertragen werden sollten, einer solchen Methylierung unter-



zogen. Diese erfolgte durch Elektroporation des entsprechenden Plasmids in *E. coli* ER2275[pAN1], der die  $\Phi$ 3TI-Methyltransferase auf dem pACYC184-Abkömmling pAN1 codiert enthält. Das die Methylcytosin-spezifische Endonuklease codierende Gen dieses Stammes ist deletiert. Der p15A-Replikationsursprung von pAN1 ist kompatibel mit dem ColE1-Replikon. Alle zu Zwecken der Transformation von *C. acetobutylicum* konstruierten Plasmide dieser Arbeit tragen dieses Replikon. Eine erfolgreiche Methylierung konnte durch Restriktion der anschließend aus *E. coli* isolierten Plasmide mit *Fnu*4HI bzw. *Sat*I, methylierungs-sensiblen Isoschizomeren von *Cac*824I, überprüft werden.

Die Transformation war für das *sense*- und *antisense*- Plasmid des Gens *adcR* (pBS78-79) und für das *sense*- und *antisense*- Plasmid des Gens *adcS* (pBS80-81) erfolgreich. Die Plasmide, die gleichzeitig das *adcR*- und *adcS*-Gen in *sense*- bzw. *antisense*-Orientierung enthielten, konnten nicht erfolgreich übertragen werden.

#### 3.1.3.1.2 Wachstumsversuche und gaschromatographische Charakterisierung der *sense*- und *antisense*-Plasmid-tragenden *C. acetobutylicum*-Stämme

Wie beschrieben sollte die Übertragung der *sense*-Plasmide (pBS78 und pBS80) in *C. acetobutylicum* zu einer starken Überexpression der Gene führen bzw. die Übertragung der *antisense*-Plasmide (pBS79 und pBS81) eine Inhibition der Translation der Gene verursachen.

Die Transformanten *C. acetobutylicum* [pBS78], [pBS79], [pBS80] und [pBS81] wurden in einem Wachstumsversuch in 500-ml-MES-gepuffertem Medium eingesetzt. Der Verlauf des Wachstums (**Abb. 16**) sowie die Konzentration des produzierten Lösungsmittels Aceton (**Tab. 14**) wurde untersucht.

Das Wachstum der *C. acetobutylicum*-Mutante, die das Kontrollplasmid pIMP1 trug, unterschied sich nicht von dem Wachstum des Wildtyps (WT) von *C. acetobutylicum* und auch das Wachstum der beiden *antisense*-Mutanten war im Vergleich mit dem Wachstum des Wildtyps nicht beeinträchtigt. Die Wachstumsrate  $\mu$  dieser Stämme betrug 0,13/h und sie erreichten eine maximale optische Dichte von 4-5. Das Wachstum der beiden *sense*-Mutanten hingegen war im Vergleich mit dem Wachstum des Wildtyps stark verlangsamt, die Wachstumsrate  $\mu$  dieser Stämme betrug 0,08/h und die erreichte maximale optische Dichte lag bei 2-2,5. Phänotypisch unterschieden sich die *sense*- und *antisense*-Mutanten dahingehend vom WT und dem Kontrollplasmid-tragenden Stamm, daß die einzelnen Zellen ca. doppelt so lang und dünner waren. Alle rekombinanten

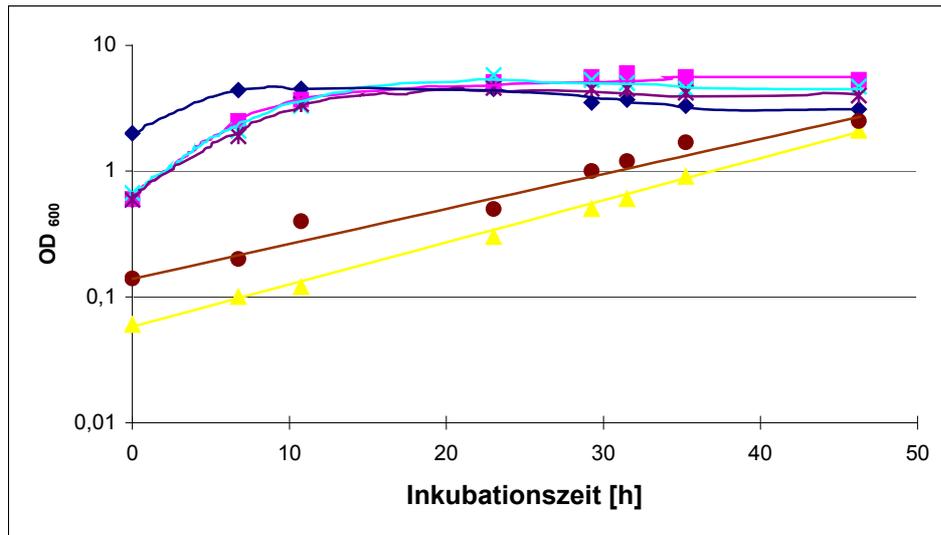


Abb. 16 Wachstum der *C. acetobutylicum* Stämme *C. acetobutylicum* WT (—) *C. acetobutylicum* WT [pIMP1] (—), *C. acetobutylicum* WT [pBS78] (—), *C. acetobutylicum* WT [pBS79] (—), *C. acetobutylicum* WT [pBS80] (—), *C. acetobutylicum* WT [pBS81] (—) in 500-ml-MES-gepuffertem Medium

Tab. 14 Analyse der Acetonproduktion der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme

<i>C. acetobutylicum</i> Stamm	Acetonkonzentration [mM]	
	50 ml MES-Mediumn (OD <sub>600</sub> 1,5)	500 ml MES-Medium (OD <sub>600</sub> 2,5)
WT [pIMP1]	1,0	6,4
WT [pBS78]	0,6	0,1
WT [pBS79]	0,8	0,6
WT [pBS80]	2,4	13,1
WT [pBS81]	0,1	1,1

Stämme waren in der Lage, mikroskopisch gut sichtbare Sporen zu bilden. Ein Vergleich der Acetonproduktion (Tab. 14) der verschiedenen Stämme ergab folgendes Bild: Der Stamm, der AdcS überproduzierte (WT[pBS80]), wies im Falle des Wachstums in einer 50-ml- und 500-ml-Kultur die höchste Acetonkonzentration von 13,1 mM auf. Damit ist die Konzentration mehr als doppelt so hoch als bei dem Stamm, der das Kontrollplasmid trug. Eine Überproduktion des Proteins AdcR führte im Falle des Wachstums in einer 500-ml-Kultur zu nahezu keiner Acetonproduktion.

### 3.1.3.2 Inaktivierung der Gene *adcR* und *adcS* in *C. acetobutylicum*

Eine eindeutigere Bestimmung der Funktion der Proteine AdcR und AdcS wäre über eine vollständige Ausschaltung der zugehörigen Gene gegeben, da das Genprodukt in diesem Fall nicht mehr gebildet werden könnte. Wie bereits beschrieben würde eine gaschromatographische Bestimmung des Produktspektrums des rekombinanten Stammes anschließend Aufschluß über den Einfluß des fehlenden Genprodukts auf die Lösungsmittelbildung geben.

Eine Möglichkeit der Inaktivierung eines Gens besteht in der Konstruktion einer Integrationsmutante, eine weitere, noch sicherere Methode ist die Konstruktion einer Deletionsmutante. Im ersten Fall wird das Gen durch die Integration einer Antibiotikaresistenzkassette in das chromosomale oder im Falle von *C. acetobutylicum* in das Megaplasmid-codierte Gen unterbrochen. Im zweiten Fall wird die Sequenz des Gens ebenfalls durch das Einbringen einer Resistenzkassette unterbrochen, ein Teil der Sequenz des Gen wird jedoch zusätzlich deletiert, so daß bei einem Verlust der integrierten Resistenzkassette die native Sequenz des Gens dennoch nicht wieder hergestellt wird. Ein intaktes Translationsprodukt kann bei dieser Methode der Geninaktivierung somit ausgeschlossen werden. In beiden Fällen verläuft die Herstellung der Mutanten über Plasmide, die in *C. acetobutylicum* eingebracht werden und dort dann, auf Grund homologer Sequenzbereiche, unter entsprechenden Bedingungen rekombinieren. Eine erste homologe Rekombination führt in beiden Fällen zur einer Integration des Plasmids in das Chromosom bzw. Megaplasmid. In einer zweiten homologen Rekombination kann anschließend das Plasmid wieder herausgeschnitten werden, und zwar derart, daß das entsprechende Gen entweder nur durch das Resistenzgen unterbrochen (Integrationsmutante) oder ein Teil des entsprechenden Zielgens dabei zusätzlich entfernt wird (Deletionsmutante). In beiden Fällen ist außerdem, anstelle der zweiten Rekombination, auch der Verlust des, in der ersten Rekombination integrierten, DNA-Bereichs möglich, was zur Wiederherstellung der Ausgangssituation (Wildtyp) führt.

#### 3.1.3.1.1 Konstruktion von Integrationsplasmiden

Als Ausgangsplasmid für die Konstruktion von Integrationsplasmiden zur Inaktivierung der Gene *adcR* und *adcS* wurde das von Prof. Dr. E. T. Papoutsakis (Northwestern University, Evanston) zur Verfügung gestellte Plasmid pETSP0 verwendet. Mit Hilfe dieses Plasmids gelang die Inaktivierung des Gens *spo0A* (Harris et al., 2002), das für den globalen Transkriptionsregulator Spo0A codiert. Zunächst waren einige Umklonierungsschritte notwendig, um ein Ausgangsplasmid (pLF3) zu schaffen (**Abb. 17**), das schließlich derart verändert werden konnte, daß

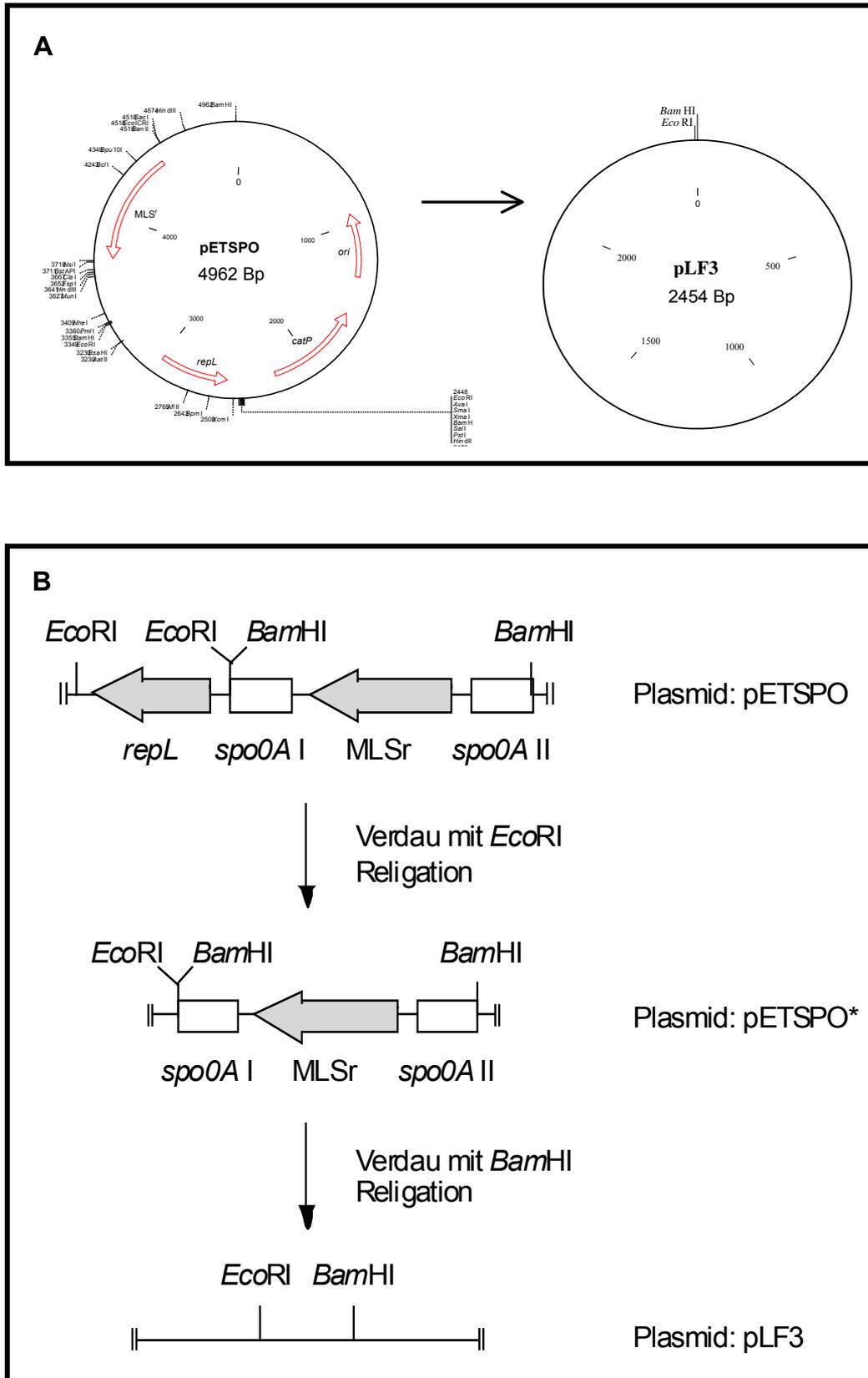


Abb. 17 Umklonierung des Plasmids pETSPO

A) Plasmide pETSPO und pLF3 (hergestellt über: Clone Manger 7 und Enhance Map Draw)

B) Klonierungsschritte (schematisch) zur Herstellung des Plasmids pLF3 (aus: Feustel, 2004)

die Inaktivierung eines gewünschten Gens möglich war. Die Umklonierungen wurden von Feustel (2004) durchgeführt. Das Plasmid pETSPO wurde zunächst mit dem Enzym *EcoRI* verdaut, was dazu führte, daß der Replikationsursprung und die Multiple Klonierungsstelle (MCS) entfernt wurden. Ein anschließender Verdau mit *BamHI* entfernte die Resistenzkassette  $MLS^r$  und die *spo0A*-Sequenzen. Das erhaltene Plasmid war das Plasmid pLF3, das nur noch aus dem Rückgrat des Ursprungsplasmids bestand und für weitere Klonierungen eingesetzt wurde. Für die Herstellung des Integrationsplasmids für das Gen *adcR* wurde dieses zunächst als 643-Bp-großes Fragment unter Anwendung einer Standard-PCR amplifiziert, wobei über die *Primer* 37BamHI und 37EcoRI die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* generiert wurden. Das derart verdaute Fragment wurde in das entsprechend verdaute Plasmid pLF3 kloniert. Im Anschluß daran wurde der Replikationsursprung *repL* (Feustel, 2004) ungerichtet über einen *EcoRI*-Verdau und schließlich die Resistenz vermittelnde Kassette  $MLS^r$  über einen *EcoRI*-Verdau kloniert. Die theoretisch möglichen Plasmide sind in **Abb. 18** dargestellt. Die Klonierungen zur Herstellung des Integrationsvektors für das *adcS*-Gen verliefen entsprechend. In diesem Fall wurde das 751-Bp-große *adcS*-Fragment (*Primer* 36BamHI und 36EcoRI) allerdings mit einer *XhoI*-verdauten Resistenzkassette unterbrochen. Die theoretisch möglichen Plasmide sind ebenfalls in **Abb. 18** zu sehen.

Die Herstellung eines Integrationsplasmids für das *adcR*-Gen verlief erfolgreich. Theoretisch möglich sind zwei Varianten des Plasmids, da das Einbringen des *repL*-Gens ungerichtet geschah. Welches der beidem Plasmide bei der tatsächlichen Klonierung entstanden war, wurde noch nicht geklärt, und auch das Einbringen des Plasmids in *C. acetobutylicum* blieb bislang erfolglos.

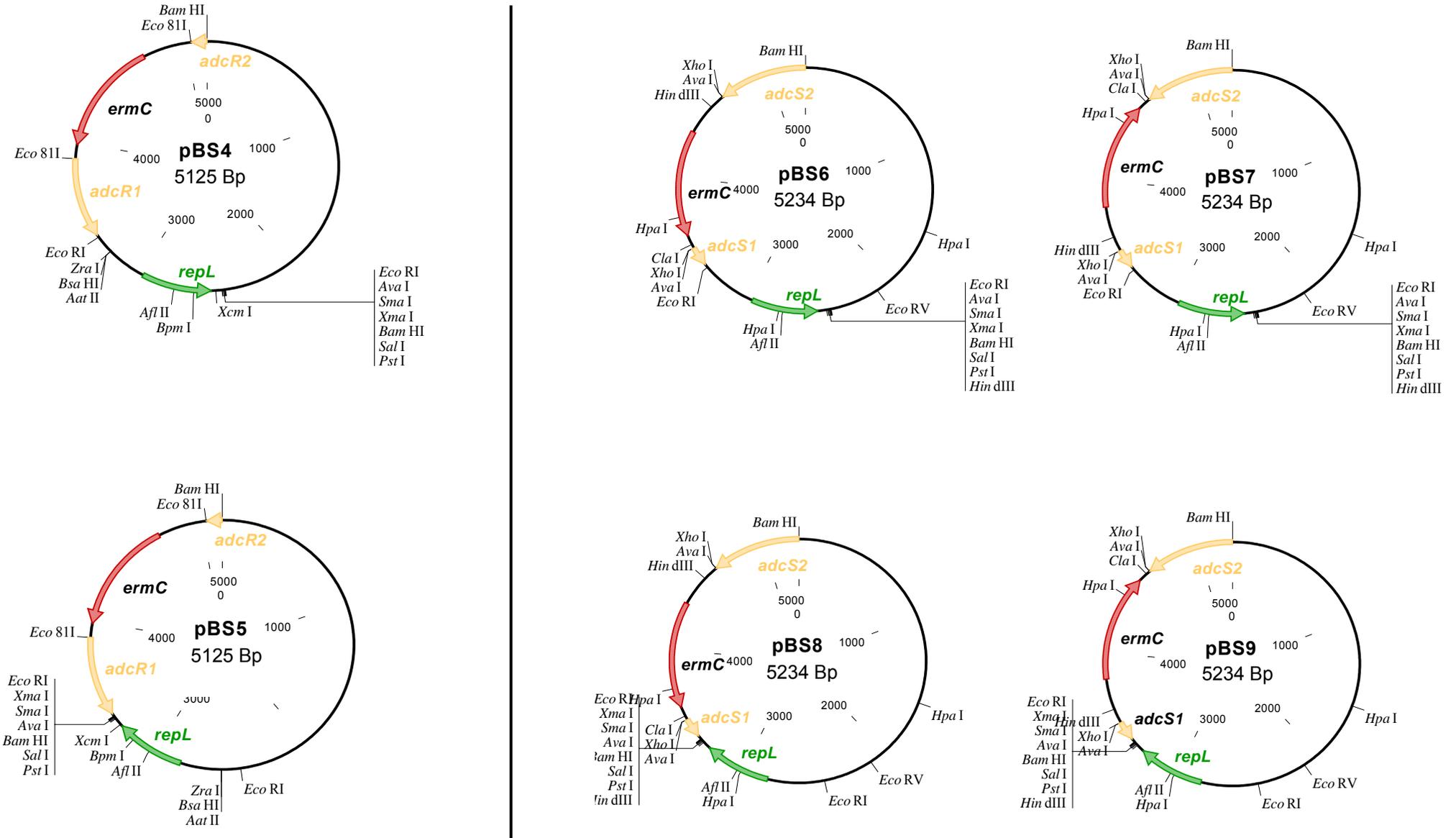
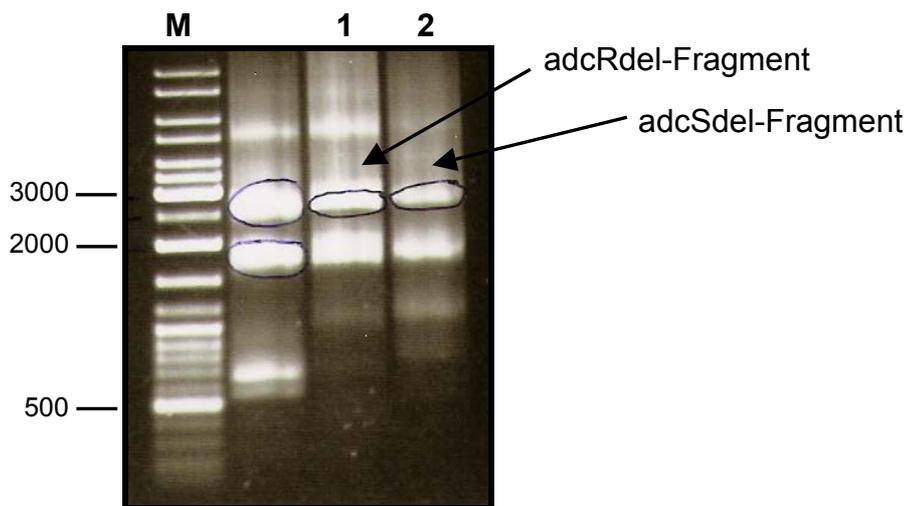


Abb. 18 Integrationsplasmide für die Gene *adcR* und *adcS*  
(hergestellt über: Clone Manager 7 und Enhance Map Draw)

### 3.1.3.1.2 Konstruktion von Deletionsplasmiden

Zur Herstellung von Deletionsplasmiden für die Gene *adcR* und *adcS* fand die LFH- (*long flanking homology*-) PCR Anwendung. Diese wurde ursprünglich entwickelt, um schnell Deletionsfragmente für die Transformation in Hefen zu erstellen (Wach et al., 1996). In der LFH-PCR fusionieren, in einer *Joining*-PCR, drei zuvor über eine Standard-PCR amplifizierte, einzelne DNA-Fragmente. Bei diesen Fragmenten handelt es sich um ein Resistenz vermittelndes Gen und zwei Bereiche, die homolog zum 5'- bzw. 3'-Ende des Zielgens sind. Auf Grund ihrer Lage zum Gen wurden letztgenannte Amplifikate im Weiteren als *up*- bzw. *down*-Fragment bezeichnet. Für die Amplifikation des *down*-Fragments des *adcR*-Gens wurden die *Primer* *adcRdofwSal* und *adcRdorevcatP* verwendet. Der *Primer* *adcRdofwSal* fügte am 5'-Ende des Fragments eine *SalI*-Schnittstelle ein und der *Primer* *adcRdorevcatP* hingte am 3'-Ende des Fragments einen 32-Bp-langen Überhang an, der homolog zu einem Bereich des *catP*-Gens war. Das Genprodukt dieses Gens ermöglicht die Resistenz gegenüber Chloramphenicol. Für die Amplifikation des *up*-Fragments wurden die *Primer* *adcRupfwcatP* und *adcRuprevBamHI* verwendet. Der *Primer* *adcRupfwcatP* hingte am 5'-Ende des Fragments einen 38-Bp-langen Überhang an, der homolog zu einem Bereich des *catP*-Gens war, und der *Primer* *adcRuprevBamHI* fügte am 3'-Ende des Fragments eine *BamHI*-Schnittstelle ein. Beide Fragmente konnten in einer Standard-PCR unter Verwendung einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C amplifiziert werden. Gleiches galt für das Fragment des *catP*-Gens, für dessen Amplifikation die *Primer* *catPfw* und *catPprev* verwendet wurden. Die Amplifikation des *catP*-Gens lieferte ein 703-Bp-großes, die Ampifikation des *down*-Fragments ein 1092-Bp-großes und die des *up*-Fragments ein 1050-Bp-großes PCR-Produkt. Im Ansatz für die *Joining*-PCR lagen das *up*-, *down*- und *catP*-Fragment im Verhältnis 1: 1: 4 vor, und es wurden dem Ansatz außerdem die *Primer* *adcRdofwSal* und *adcRuprevBamHI* zugegeben. Die Hybridisierungstemperatur lag bei 50 °C. In der *Joining*-PCR lagerten sich die homologen Bereiche des *catP*-Gens zusammen, und die Zugabe der äußeren *Primer* sowie eine schrittweise Verlängerung der Elongationszeit erlaubten die Amplifikation des gesamten Fragments (*adcRdel*) mit einer Länge von 2845 Bp (**Abb. 19**). Im Falle des *adcS*-Gens wurde entsprechend vorgegangen. Das *down*-Fragment wies in diesem Fall eine Länge von 1117 Bp und das *up*-Fragment eine Länge von 1113 Bp auf. Das Gesamtfragment (*adcSdel*) war 2933 Bp lang (**Abb. 19**). Die beiden Deletionsfragmente *adcRdel* und *adcSdel* wurden, auf Grund der zahlreichen Nebenprodukte, aus dem Gel aufgereinigt und einem *SalI*-*BamHI*-Verdau unterzogen. Die derart behandelten Fragmente sollten jeweils in entsprechend verdautes pIMP1-Plasmid kloniert und in *C. acetobutylicum* transformiert werden. Die Klonierung blieb jedoch für beide Fragmente erfolglos.



**Abb. 19** PCR-Produkte der *Joining-PCR* (Agarosegel 2 %, w/v),  
 1: adcRdel-Fragment;  
 2: adcSdel-Fragment;  
 M: Größenstandard in Bp  
 Die korrekten Fragmente sind mit Pfeilen gekennzeichnet und beschriftet.

### 3.1.4 Überproduktion und Reinigung des *his-tag*-Fusionsproteins AdcR bzw. AdcS

Für die Charakterisierung der Proteine AdcR und AdcS war es notwendig, größere Mengen in gereinigter Form zu gewinnen. Dazu wurden sie heterolog in *E. coli* als *his-tag*-Fusionsproteine überproduziert. Die Modifikation in Form von sechs Histidinen (*his-tag*), die C-terminal an das jeweilige Protein angehängt wurden, ermöglichten die Reinigung der Proteine über eine Affinitätschromatographie.

#### 3.1.4.1 Klonierung des Gens *adcR* bzw. *adcS* in einen Überexpressionsvektor

Um einem eventuell toxischen Effekt der Genprodukte AdcR und AdcS in *E. coli* zu begegnen, wurde für die Überproduktion ein Expressionssystem gewählt, das eine Repression der Transkription der zugehörigen Gene *adcR* und *adcS* vor der Induktion gewährleistete. Ein toxischer Effekt wäre für das AdcR-Protein denkbar, bedingt durch mögliche unspezifische Bindung des Proteins an DNA, verursacht durch das vorausgesagte N-terminale DNA-Bindemotiv (*helix-turn-helix*-Motiv). Das Expressionssystem der Wahl war das pET-Expressionssystem (Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH; Schwalbach). Ein Zusammenwirken von Ex-

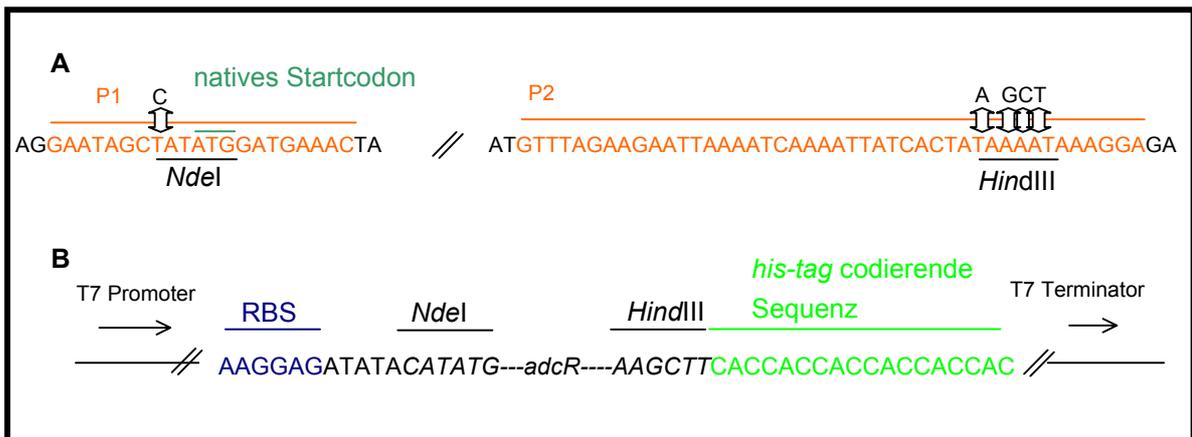


Abb. 20

**Skizze zur Klonierungsstrategie des Gens *adcR* in den Vektor pET29a(+)**

- A)** klonierungsrelevanter Ausschnitt des *adcR*-Gens  
orange: P1 und P2: *Primer ygaS1hinCI* und *ygaS2rückCI*, dunkelgrün: natives Startcodon
- B)** klonierungsrelevanter Ausschnitt des pET29a(+)-Vektors  
blau: Ribosomenbindestelle (RBS), hellgrün: *his-tag* codierende Sequenz

Das unter A dargestellte PCR-Produkt wurde einem *NdeI-HindIII*-Verdau unterzogen und in den entsprechend verdauten und dephosphorylierten pET29a(+)-Vektor kloniert (B).

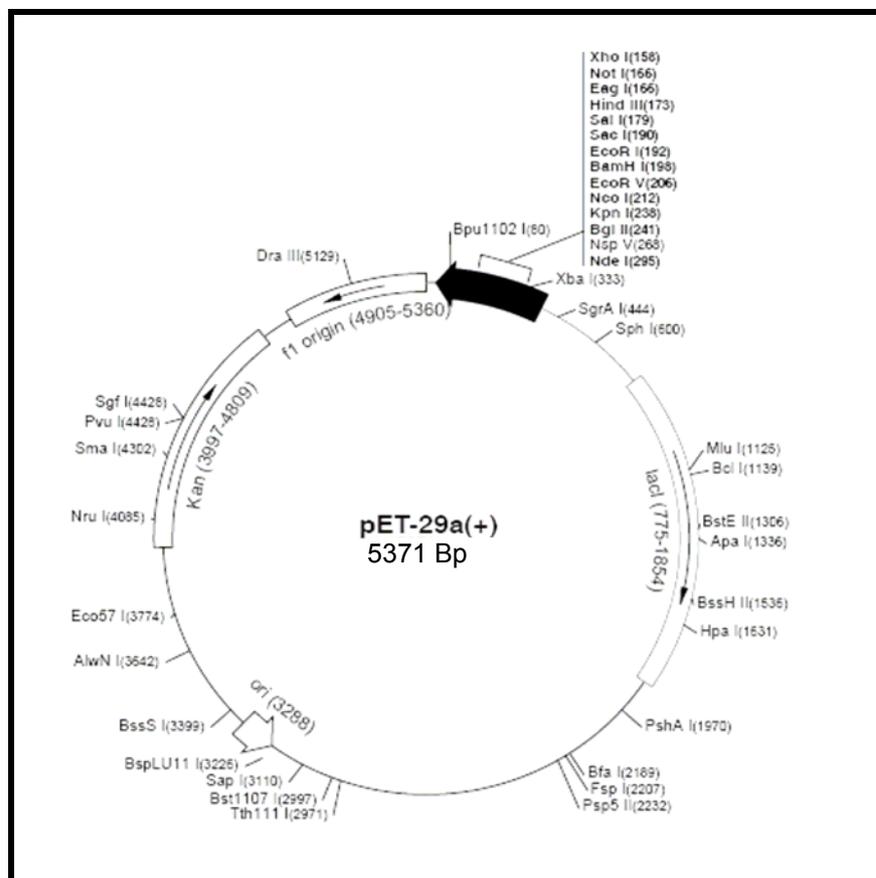


Abb. 21

pET29a (+) (<http://embioscience.com/html/NVG/home.html>)

pressionsstamm und -vektor garantiert in diesem System eine minimale Hintergrundexpression. Für die Klonierung des Gens *adcR* bzw. *adcS* wurde im Speziellen der Vektor pET29a(+) (**Abb. 21**) gewählt. Dieser hat einen T7<sub>lac</sub>-Promoter, der unter der Kontrolle der T7-RNA-Polymerase steht. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase liegt auf dem Chromosom des *E. coli* Stammes BL21 (DE3). Dieser Stamm enthält den lysogenen Bakteriophagen DE3, eine Deletionsmutante des Phagen  $\lambda$ , die das Gen der T7-RNA-Polymerase im *int*-Locus trägt. Dort steht es wiederum unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promoters. Auf dem Vektor pET29a(+) befindet sich außerdem das Gen für den *lac*-Repressor, *lacI*, und die *lac*-Operator Sequenz. In Abwesenheit von IPTG wird der *lac*-Repressor konstitutiv exprimiert. Des weiteren kann mit Hilfe des pET29a(+)-Vektors, durch das Einbringen des entsprechenden Gens in die Multiple Klonierungsstelle (MCS), für das Genprodukt eine Fusion mit sechs Histidinen am C-Terminus erreicht werden.

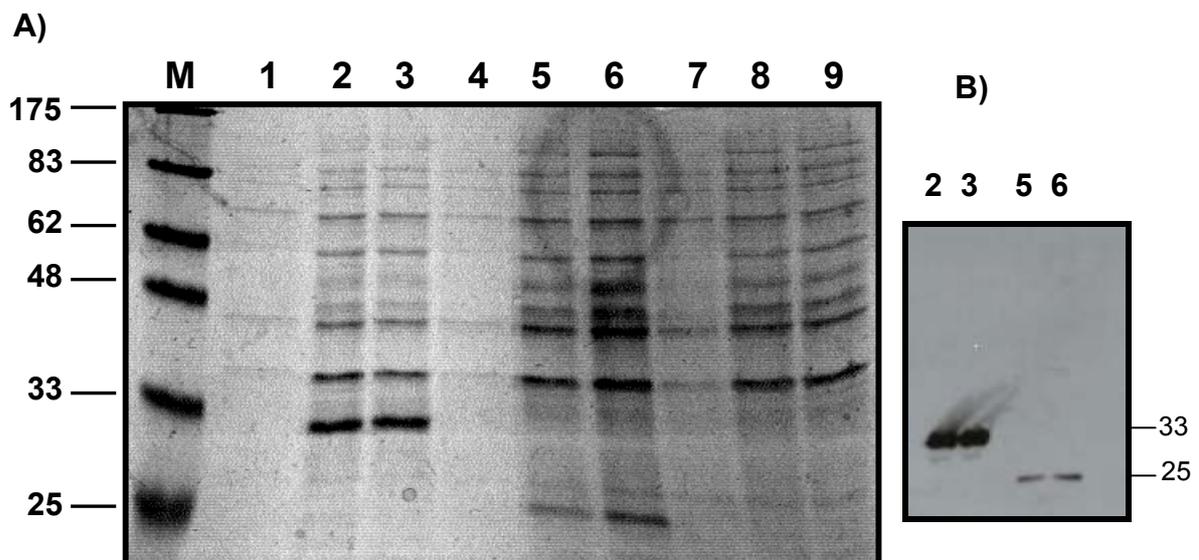
Das *adcR*-Strukturgen wurde mit den Oligonukleotiden ygaS1hinCI und ygaS2rückCI unter Anwendung einer Standard-PCR amplifiziert. Mit ygaS1hinCI wurde im 5'-Bereich des Gens eine *NdeI*-Schnittstelle eingefügt, die sich nach Ligation im idealen Abstand zur Ribosomenbindestelle (RBS) befand und so eine Klonierung beginnend mit dem nativen ATG-Startcodon ermöglichte (**Abb. 20**). Die Verwendung des Oligonukleotids ygaS2rückCI, der im 3'-Bereich des Gens eine *HindIII*-Schnittstelle einfügte, erlaubte eine Fusion des Gens mit der im Vektor codierten Sequenz für sechs Histidine (**Abb. 20**). Das entstandene Plasmid pBS2 sollte die Produktion eines 215-AS-angen Fusionsproteins mit C-terminalem 6xHis-Rest ermöglichen. Im Falle des Gens *adcS* wurden zur Klonierung die Oligonukleotide yhbE1hinCI und yhbE2rückCI verwendet und entsprechend *adcR* verfahren. Das entstandene Plasmid pBS1 sollte die Produktion eines 248-AS-langen Fusionsproteins mit C-terminalem 6xHis-Rest ermöglichen. Beide Klonierungen wurden in einer DNA-Sequenzierung überprüft und bestätigt.

#### 3.1.4.2 Heterologe Produktion und native Reinigung des Proteins AdcR x 6His bzw. AdcS x 6His

Die rekombinanten *E. coli*-Stämme BL21[pBS1] und BL21[pBS2] wurden jeweils in 250 ml LB-Medium unter entsprechender Antibiotikumselektion angezogen. Die Produktion der Fusionsproteine wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 durch die Zugabe von IPTG induziert. Zum Zeitpunkt der Induktion und zu zahlreichen späteren Zeitpunkten wurden 1-ml-Aliquots entnommen und wiederum Aliquots davon in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (**Abb. 22A**). Bereits 1,75 h nach der Induktion mit IPTG war eine verstärkte Produktion des jeweiligen Proteins AdcR x 6His bzw. AdcS x 6His zu erkennen. Um sicher zu stellen, daß es sich bei

den überproduzierten Proteinen um die entsprechenden Proteine handelte, erfolgte ein immunologischer Nachweis des 6xHis-Rests mit *his-tag* spezifischen Maus-Anti-His<sub>6</sub>-Antikörpern. Dazu wurden Aliquots der entnommenen Proben wie in **Abb. 22A** über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der *Western blot* in **Abb. 22B** lieferte den Nachweis, daß es sich bei den überproduzierten Proteinen um die erwarteten Proteine AdcR x 6His und AdcS x 6His handelte. Die über das SDS-Polyacrylamidgel bestimmten Proteinmassen stimmten mit den errechneten molekularen Massen von ca. 25 kDa für das native Protein AdcR und ca. 32 kDa für das native Protein AdcS überein.

Erste Untersuchungen zeigten, daß eine Reinigung des Fusionsproteins AdcR x 6His bzw. AdcS x 6His im Maßstab eines 1,5-ml-Reaktionsgefäßes an Ni-NTA-Agarose, sowohl unter denaturierenden Bedingungen mit harnstoffhaltigem



**Abb. 22 A) Analyse der heterologen Überproduktion der Fusionsproteine AdcR x 6His (Spuren 1-3) und AdcS x 6His (Spuren 4-6) in *E. coli* BL21 (DE3) (SDS-Polyacrylamidgel, 10 % (w/v), Coomassie-Färbung)**

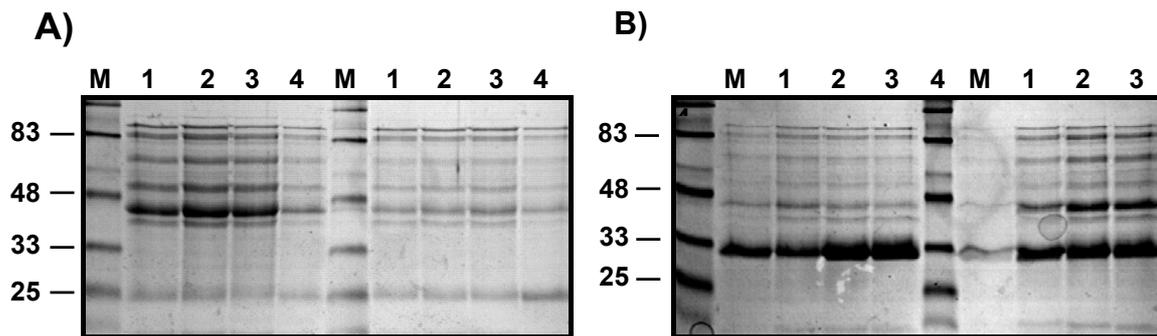
1: Rohextrakt (40 µl) vor Induktion; 2: Rohextrakt (20 µl) 1,75 h nach Induktion; 3: Rohextrakt (20 µl) 2,25 h nach Induktion; 4: Rohextrakt (40 µl) vor Induktion; 5: Rohextrakt (20 µl) 1,75 h nach Induktion; 6: Rohextrakt (20 µl) 2,25 h nach Induktion; **M**: Proteingrößenstandard in kDa

In den Spuren 7-9 sind Aliquots des Kontrollstammes (*E. coli* BL21 [pET29a(+)]) aufgetragen. Dieser Stamm wurde entsprechend den beiden anderen Stämmen behandelt: 7: vor Induktion; 8: 1,75 h nach Induktion; 9: 2,25 h nach Induktion

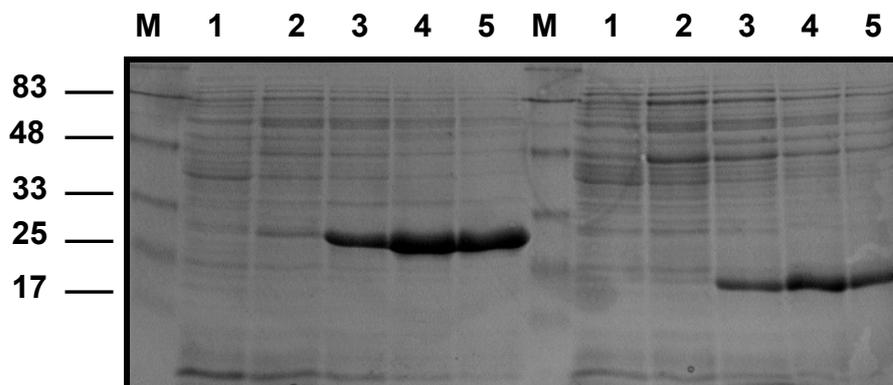
**B) Western blot: Nachweis des 6xHis-Rests über spezifische Antikörper**

2, 3: Protein AdcR x 6His; 5, 6: Protein AdcS x 6His; Größenangabe in kDa

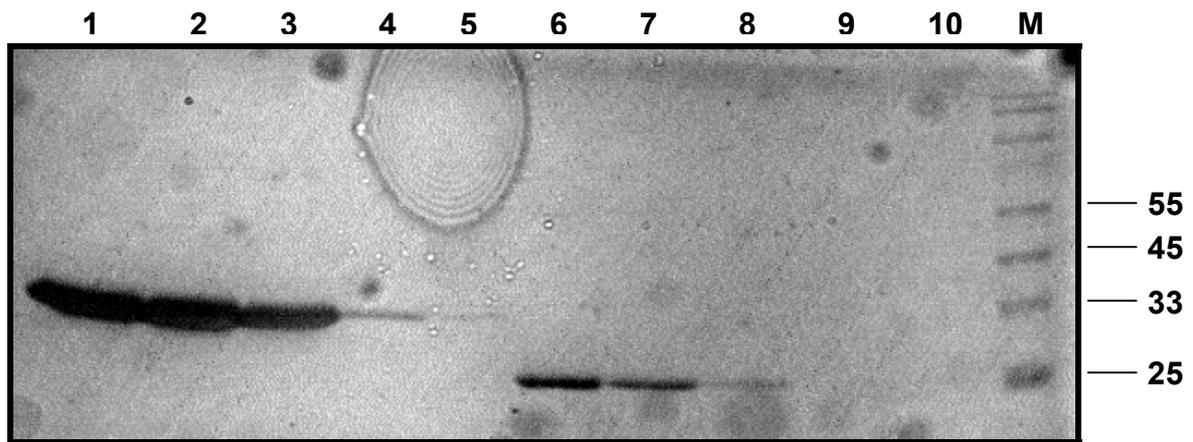
Wasch- und Elutionspuffer (**Abb. 23**) als auch unter nativen Bedingungen mit imidazolhaltigem Wasch- und Elutionspuffer (**Abb. 24**), möglich war. Im Fall der denaturierenden Reinigung war eine deutliche Überproduktion der Proteine AdcR x 6His und AdcS x 6His zu erkennen, die einzelnen Elutionsfraktionen der Affinitätsreinigung waren jedoch stark mit anderen Proteinen verunreinigt. Im Fall der nativen Reinigung zeigte sich, daß beide Proteine ab einer Imidazolkonzentration von 150 mM im Puffer eluiert wurden.



**Abb. 23** Denaturierenden Reinigung der Fusionsproteine AdcR x 6His (A) und AdcS x 6His (B) (SDS-Polyacrylamidgel, 10 % (w/v), Coomassie-Färbung)  
1, 2: Waschfraktion 500 µl mit 8 M Harnstoff, davon 50 µl; 3, 4: Elutionsfraktionen 50 µl mit 8 M Harnstoff, davon 50 µl; M: Proteingrößenstandard in kDa



**Abb. 24** Nativen Reinigung der Fusionsproteine AdcR x 6His (Spuren 1-5) und AdcS x 6His (Spuren 6-10) (SDS-Polyacrylamidgel, 10 % (w/v), Coomassie-Färbung)  
1: Waschfraktion 800 µl mit 20 mM Imidazol, davon 80 µl; 2: Elution 100 µl mit 75 mM Imidazol, davon 80 µl; 3: Elution 100 µl mit 150 mM Imidazol, davon 80 µl; 4: Elution 100 µl mit 250 mM Imidazol, davon 80 µl; 5: Elution 100 µl mit 250 mM Imidazol, davon 80 µl; M: Proteingrößenstandard in kDa

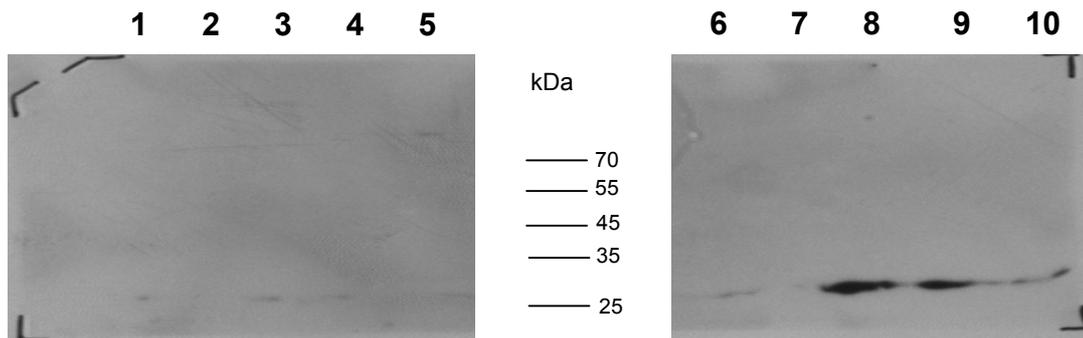


**Abb. 25** Native Reinigung der Fusionsproteine AdcR x 6His (Spuren 1-5) und AdcS x 6His (Spuren 6-10) (präparativer Maßstab, SDS-Polyacrylamidgel, 12 % (w/v), Coomassie-Färbung)  
1, 2, 3, 6, 7, 8: Elution 1 ml mit 200 mM Imidazol, davon 20 µl; 4, 5, 9, 10: Elution 1 ml mit 75 mM Imidazol, davon 20 µl; M: Proteingrößenstandard in kDa

Für eine Reinigung im präparativem Maßstab (**Abb. 25**) wurden eine 250 ml-Kultur 3-4 h nach der Induktion geerntet ( $OD_{600}$  ca. 3-4), und die Zellen mit Hilfe einer 'French<sup>®</sup> Press' in 7 ml 10 mM Imidazol-Puffer aufgeschlossen. Die Reinigung erfolgte über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. Da bereits eine Imidazolkonzentration von 150 mM im Puffer zur Elution des Proteins AdcR x 6His bzw. AdcS x 6His führte, wurde der Waschschrift mit einem Puffer, der eine Imidazolkonzentration von 20 mM enthielt, durchgeführt und zwar mindestens mit 20fachem Bettvolumen. Wurde anschließend 2mal eine Elution mit 1 ml 75 mM und 3mal eine Elution mit 1 ml 200 mM Imidazol im Puffer durchgeführt, so konnten die Proteine nahezu rein erhalten werden. Die Konzentration des eluierten AdcR x 6His-Proteins lag mit 500 µg/ml unter der Konzentration des eluierten AdcR x 6His-Proteins mit 2,5 mg/ml.

#### 3.1.4.3 Lokalisation des heterolog überproduzierten Proteins AdcR x 6His

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die vorausgesagte transmembrane Domäne des Proteins AdcR tatsächlich eine Funktion in der Verankerung des Proteins in der Membran haben könnte, wurde die Lokalisation des Proteins AdcR x 6His in *E. coli* BL21(DE3) untersucht. Dazu wurden die Membran- und Cytosolproteine des Stammes *E. coli* BL21[pBS2] nach Wachstum auf LB-Medium unter entsprechender Antibiotikumselektion getrennt voneinander präpariert, über



**Abb. 26** Lokalisation des Proteins AdcR x 6His in *E. coli* BL21(DE3) (Western blot)

1-5: Membranfraktion (mehrfach unverdünnt aufgetragen)

6-10: Cytosolfraktion (mehrfach unverdünnt aufgetragen)

ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der 6xHis-Rest des Proteins wurde anschließend immunologisch über den spezifischen Maus-Anti-His<sub>6</sub>-Antikörper nachgewiesen. Dem *Western blot* (**Abb. 26**) ist zu entnehmen, daß sich das Protein AdcR x 6His sowohl in der Membran-, als auch in der Cytosolfraktion nachweisen ließ, wobei die Detektion in der Membranfraktion jedoch deutlich schwächer war.

### **3.1.5 Überproduktion und Reinigung des *his-tag*-Fusionsproteins Spo0A**

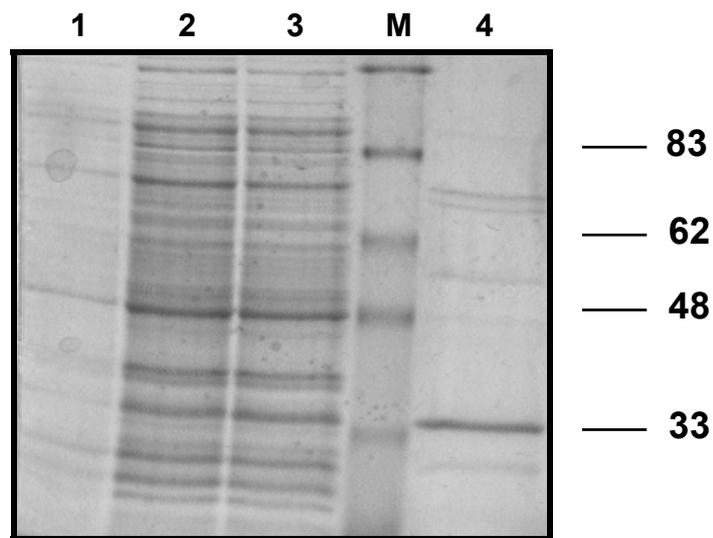
Spo0A gehört zur Familie der *response regulator*-Proteine. Derartige Proteine sind Teil eines sog. regulatorischen Zwei-Komponenten-Systems. Diese Systeme setzen sich zusammen aus einem Sensor (*sensor histidine kinase*) und einem Regulator (*response regulator*) (Albright et al., 1989; Bourret et al., 1991). Beiden Komponenten des Systems sind wiederum jeweils zwei Domänen zuzuordnen: Dem Sensor die *signal input*- und die Autokinase-Domäne und dem Regulator die Akzeptor- und die Effektor-Domäne. Nach Autophosphorylierung eines konservierten Histidin-Rests in der Autokinase-Domäne überträgt die Histidin-Kinase einen Phosphatrest auf einen konservierten Aspartat-Rest in der Akzeptor-Domäne des Regulators. Die Phosphorylierung des Regulators aktiviert daraufhin die transkriptionsaktivierende und/oder -reprimierende Eigenschaft der Effektor-Domäne. Der Phosphattransfer auf Spo0A von *B. subtilis* findet dabei nicht direkt statt, sondern wird in einem *phosphorelay* von der Histidin-Kinase A (KinA) bzw. anderen Kinasen über zwei weitere Sensorhistidin-Kinasen, Spo0F und Spo0B, auf Spo0A übertragen.

In vielen *Bacillus*- und *Clostridien*-Arten wurden mit Hilfe von Homologievergleichen *B. subtilis*-Spo0A-homologe Proteine identifiziert (Brown et al., 1994).

Das Protein Spo0A besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich aus zwei ungefähr gleich großen Domänen zusammensetzt: einer N-terminalen regulatorisch wirksamen Akzeptor-Domäne und einer C-terminalen Effektor-Domäne. Die regulatorisch wirksame Domäne enthält alle für die Familie der *response regulator* charakteristischen Merkmale, wohingegen sich die Effektor-Domäne durch das Vorhandensein eines konservierten *helix-turn-helix*-Motivs auszeichnet, das für die DNA-bindende Eigenschaft des Proteins verantwortlich ist. Die Überproduktion und Reinigung des Spo0A-Proteins aus *B. subtilis* ist zwar möglich (Grimsley et al., 1994), erwies sich aber als schwierig, da das Protein in größeren Mengen für *E. coli* toxisch ist. Ein rekombinantes vollständiges *C. acetobutylicum* Spo0A-Protein wurde auf Grund dessen nur unter Schwierigkeiten gereinigt. Erst 2003 gelang Hollergschwandner die Überproduktion und Reinigung des Spo0A-Proteins unter Anwendung einer *his-tag*-Fusion und einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

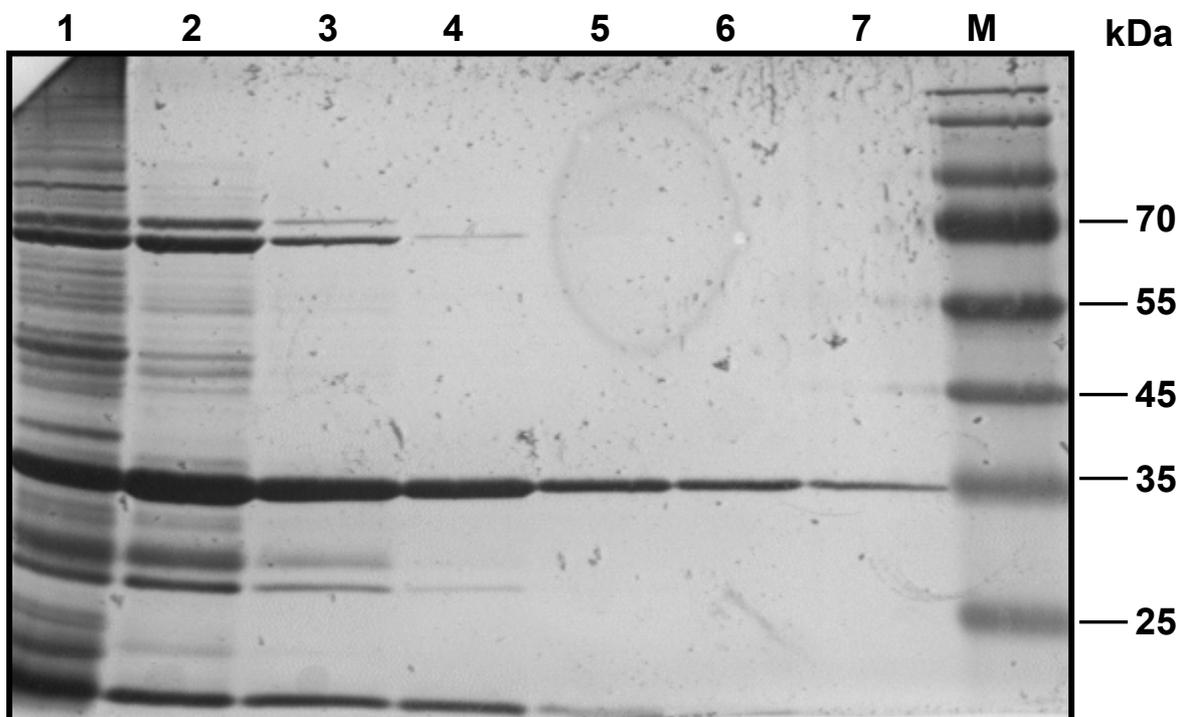
Die Überproduktion und Reinigung des *his-tag*-Fusionsproteins Spo0A erfolgte in dieser Arbeit basierend auf einem von Hollergschwandner (2003) entwickelten Protokoll. Das hierbei eingesetzte Plasmid pSOA setzt sich zusammen aus dem Plasmid pET31(+) und dem *spo0A*-Gen, das derart kloniert wurde, daß das translatierte Protein am C-Terminus einen Schwanz aus sechs Histidinen trug. Der Vektor pET31(+) gehört, wie der bereits beschriebene Vektor pET29a(+), dem pET-Expressionssystem an, wodurch die sich auf *E. coli* negativ auswirkende Basalexpression des *spo0A*-Gens bis zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG niedrig gehalten wurde. Eine erhöhte Ausbeute des Fusionsproteins Spo0A x 6His wurde erhalten, indem der wachsenden Kultur eine halbe Stunde nach IPTG-Zugabe zusätzlich Rifampicin zugesetzt wurde. Im Gegensatz zu Hollergschwandner (2003) erfolgte die Zugabe von IPTG erst bei dem Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,5-1,8 statt bei 0,6-0,8. Rifampicin hemmt die Synthese der *E. coli* eigenen Proteine, wodurch die Neusynthese störender DNasen verhindert wurde. Nach Auftrennung eines Aliquots des Rohextrakts aus verschiedenen Wachstumsphasen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte sich bereits 30 min nach IPTG-Zugabe eine klare Bande auf der für das Spo0A-*his-tag*-Fusionsprotein erwarteten Höhe (ca. 33 kDa) (**Abb. 27**).

Für die Reinigung des Spo0A x 6His-Proteins wurde *E. coli* BL21(DE3)[pSOA] in 500 ml TB-Medium angezogen, wie beschrieben induziert und geerntet. Die Reinigung des Proteins erfolgte über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die einzelnen Fraktionen der Reinigung wurden gegen PBS-Puffer dialysiert und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (**Abb. 28**). Es zeigte sich, daß das Protein bei einer Imidazolkonzentration von 75-200 mM im Puffer eluiert werden konnte, wobei die Elution eines nahezu reinen Proteins erst bei einer Konzentration von



**Abb. 27** Heterologe Überexpression des Proteins Spo0A x 6His in *E. coli* BL21(DE3) (SDS-Polyacrylamidgel, 12 % (w/v))

1: Rohextrakt vor Induktion; 2: Rohextrakt 30 min nach Induktion; 3: Rohextrakt 60 min nach Induktion; 4: Elution mit 200 mM Imidazol; M: Proteingrößenstandard in kDa



**Abb. 28** Native Reinigung des Proteins Spo0A x 6His (SDS-Polyacrylamidgel, 12 % (w/v)),

1, 2: Elution 1 ml mit 75 mM Imidazol, davon 20  $\mu$ l; 3, 4: Elution 1 ml mit 150 mM Imidazol, davon 20  $\mu$ l; 5, 6, 7: Elution 1 ml mit 200 mM Imidazol, davon 20  $\mu$ l; M: Proteingrößenstandard in kDa

200 mM im Puffer gegeben war. Die Konzentration des Proteins Spo0A x 6His in Spur 7 (**Abb. 28**) betrug 500 µg/ml. Die sechs Histidinreste des Fusionsproteins ließen sich in einem *Western blot* immunologisch mit spezifischen Maus-Anti-His<sub>6</sub>-Antikörpern detektieren, was eine Bande in erwarteter Höhe von ca. 33 kDa lieferte.

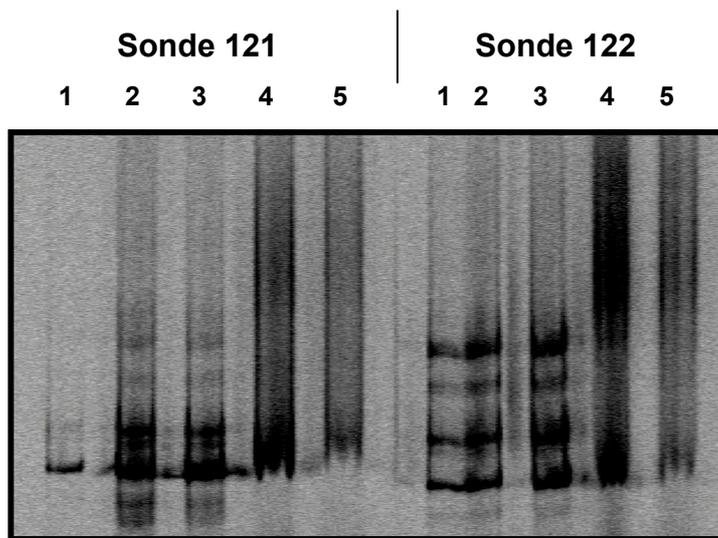
Um die Expression verschiedener Gene zu aktivieren oder reprimieren, muß der Transkriptionsfaktor Spo0A, wie alle *response regulator* (Stock et al., 1989), in phosphorylierter Form vorliegen. Die Übertragung einer Phosphatgruppe auf den jeweiligen *response regulator* erfolgt *in vivo* im Allgemeinen durch eine verwandte Histidin-Kinase, aber auch nicht verwandte Kinasen und niedermolekulare Phosphodonatoren wie z. B. Acetylphosphat sind in der Lage *in vivo* als auch *in vitro* einen *response regulator* zu phosphorylieren (Mc Cleary et al., 1993). Hollergschwandner (2003) konnte zeigen, daß die Inkubation des Fusionsproteins Spo0A x 6His mit Acetylphosphat zu einer stabilen Phosphorylierung führte, so daß das Protein auf diese Weise aktiviert werden konnte, wenn es in weiterführenden Versuche eingesetzt werden sollte.

### **3.1.6 Gelretardationsexperimente mit den Fusionsproteinen AdcR x 6His, AdcS x 6His und Spo0A x 6His**

Da es sich bei dem Protein AdcR um einen potentiellen, DNA-bindenden Transkriptionsregulator des *adc*-Gens handeln könnte, sollte anhand von Gelretardationsexperimenten, die mit gereinigtem *his-tag*-Fusionsprotein durchgeführt wurden, die Bindeeigenschaft des Proteins an die *adc*-Promoteregion überprüft und genauer charakterisiert werden. Die Operonstruktur der Gene *adcR* und *adcS* legte außerdem die Vermutung nahe, daß auch das Protein AdcS auf die Regulation des *adc*-Gens einen Einfluß haben könnte, weswegen es ebenfalls in Gelretardationsexperimenten eingesetzt wurde. Da die Sequenz stromaufwärts des Gens *adcR* eine potentielle reverse Spo0A-Bindestelle (0A-Box) vermuten läßt, sollte ebenso die Bindung des *his-tag*-Fusionsproteins Spo0A an diesen Bereich untersucht werden.

#### **3.1.6.1 Untersuchung des *adc*-Promoterbereichs**

Zunächst wurde in Vorversuchen die Methode der Wahl für die Untersuchung von sequenzspezifischen DNA-Protein-Interaktionen der Fusionsproteine AdcR x 6His und AdcS x 6His bestimmt. Gelretardationsexperimente können auf verschiedene Arten durchgeführt werden. Sie unterscheiden sich in der Art des verwendeten Gels zur Auftrennung der DNA- und DNA-Proteinkomplexe, in der Art der



**Abb. 29** Gelretardationsexperimente mit IRD800-markierten Sonden am 'LICOR<sup>®</sup>-Sequencer'

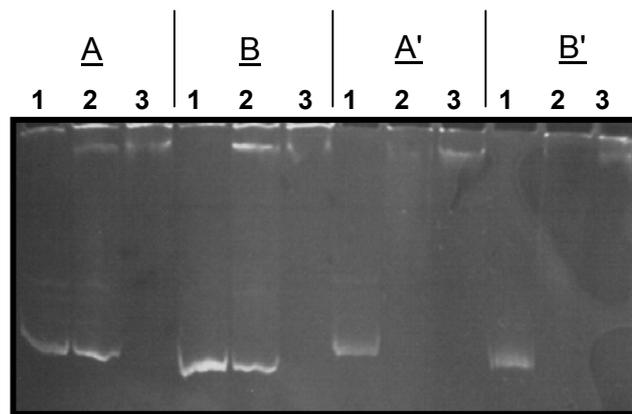
1: Sonde ohne Protein; 2: 1,5 µg Protein AdcR x 6 His; 3: 2 µg Protein AdcR x 6His; 4: 2,5 µl Rohextrakt; 5: 5,0 µl Rohextrakt

Markierung der DNA-Sonden und dementsprechend auch in der Art der Detektion der DNA und DNA-Proteinkomplexe.

In **Abb. 29** ist ein Gelretardationsexperiment zu sehen, das am 'LICOR<sup>®</sup>-Sequencer' durchgeführt wurde. Dafür waren IRD800-markierte Sonden, hergestellt über eine Standard-PCR, und die Auftrennung auf einem Poly-acrylamidgel notwendig. Die Detektion der DNA und DNA-Proteinkomplexe erfolgte während des Gellaufs über einen, sich horizontal bewegenden, Infrarotlaser. Zunächst wurden dazu die in **Abb. 6** dargestellten DNA-Fragmente, 288 Bp-WT-Fragment und 256 Bp-Del-Fragment, unter Verwendung der *Primer* *adcintlangeco* und *IRDIMP1* und der Plasmide *pIMP121* (288 Bp-WT-Fragment) und *pIMP122* (256 Bp-Del-Fragment) als Matrizen, hergestellt. Zur Vereinfachung erhielten die DNA-Fragmente die Bezeichnung Sonde 121 und Sonde 122. Eine geeignete, in Vorversuchen am 'LICOR<sup>®</sup>-Sequencer' ermittelte Konzentration der jeweiligen Sonde wurde zusammen mit verschiedenen Konzentrationen des gereinigten Fusionsproteins AdcR x 6His in einer Bindereaktion eingesetzt und anschließend auf einem nativen Polyacrylamidgel (**Abb. 29**) analysiert. Zusätzlich zum gereinigten Protein wurde die jeweilige Sonde mit ultrazentrifugiertem Rohextrakt inkubiert und ebenfalls analysiert (**Abb. 29**). Die Analyse zeigte, daß bei Verwendung des gereinigten Proteins keine Retardation der jeweiligen DNA-Sonde zu beobachten war. Bei Verwendung des Rohextrakts konnte keine Sonde mehr bzw. lediglich noch ein 'Schmier' nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf, im Rohextrakt vorhandene Nukleasen zurückzuführen ist.

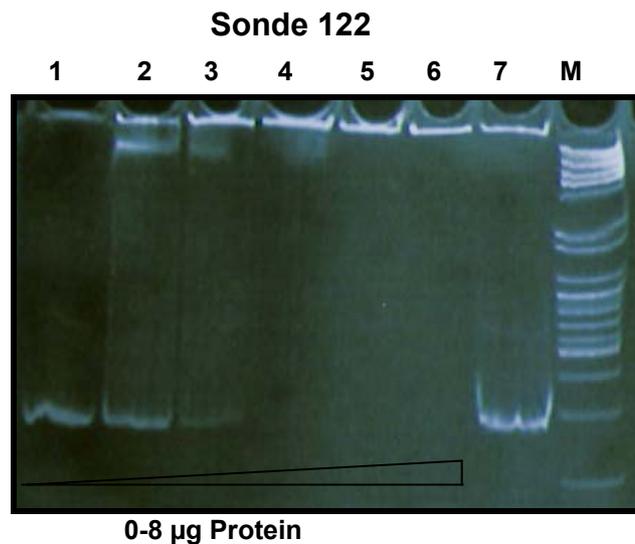
Für Gelretardationsexperimente im nativen Polyacrylamidgel mit unmarkierten Sonden, die zur Analyse der DNA-Protein-Interaktionen Ethidiumbromid-gefärbt wurden, erfolgte die Herstellung der oben beschriebenen DNA-Sonden ebenfalls über eine Standard-PCR, jedoch wurde auf die IRD800-Markierung verzichtet (*Primer* adcinlangeco und IMP1). Auch in diesem Fall wurde eine geeignete Konzentration der jeweiligen Sonde zusammen mit verschiedenen Konzentrationen des gereinigten Fusionsproteins AdcR x 6His in einer Bindereaktion eingesetzt. Die Analyse gefärbter Polyacrylamidgele (**Abb. 30 und 31**) zeigte, daß beide Sonden, Sonde 121 und Sonde 122, in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration retardiert wurden. Je höher jedoch die eingesetzte Konzentration des gereinigten Proteins war, desto schwieriger wurde der Nachweis eines spezifischen DNA-Protein-Komplexes (**Abb. 30**) und noch problematischer, eine Retardation war erst ab einer Proteinkonzentration von 1 µg zu erkennen.

Auf Grund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse der Gelretardationsexperimente am 'LICOR<sup>®</sup>-Sequencer' und der Gelretardationsexperimente im nativen Polyacrylamidgel mit unmarkierten Sonden wurden alle weiteren Gelretardationsexperimente im nativen Polyacrylamidgel mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt. In dieser Art der Experimente konnten, auf Grund der höheren Nachweisgrenze, die Konzentrationen der eingesetzten Sonden vermindert und damit der Anteil des eingesetzten Proteins im Reaktionsansatz erhöht werden.



**Abb. 30** Gelretardationsexperimente im nativen Polyacrylamidgel (8 % (w/v)) mit dem Fusionsprotein AdcR x 6His (Ethidiumbromid-Färbung)

**A)** Sonde 121 (3 µl); **A')** Sonde 121 (3 µl); **B)** Sonde 122 (2 µl); **B')** Sonde 122 (2 µl); **1:** ohne Protein; **2:** 1 µg Protein AdcR x 6 His; **3:** 3 µg Protein AdcR x 6 His

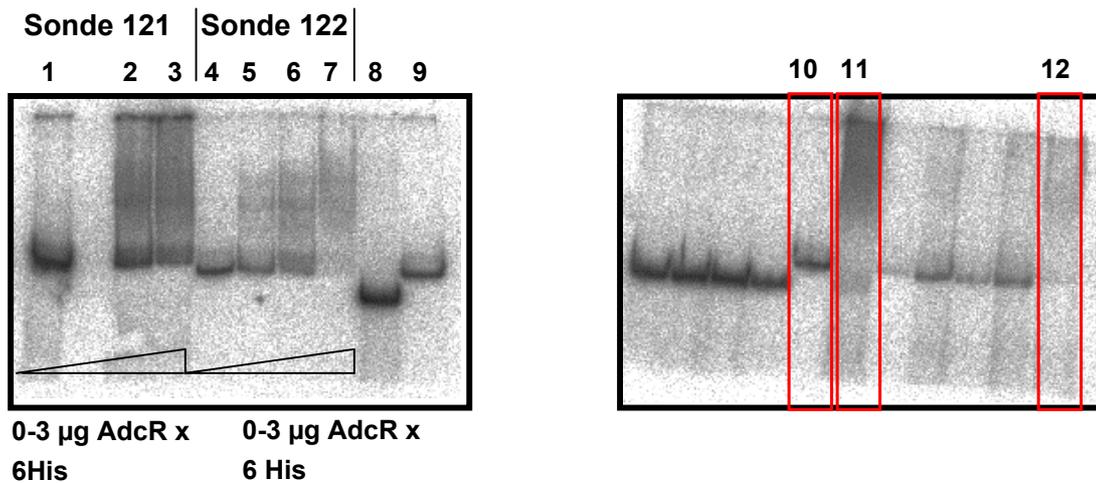


**Abb. 31** Gelretardationsexperimente im nativen Polyacrylamidgel (8 % (w/v)) mit dem Fusionsprotein AdcR x 6His (Ethidiumbromid-Färbung)

**1-6:** 0/ 1/ 2/ 3/ 5/ 8 µg Protein; **7:** Transkriptionsregulator aus *Streptococcus agalactiae*

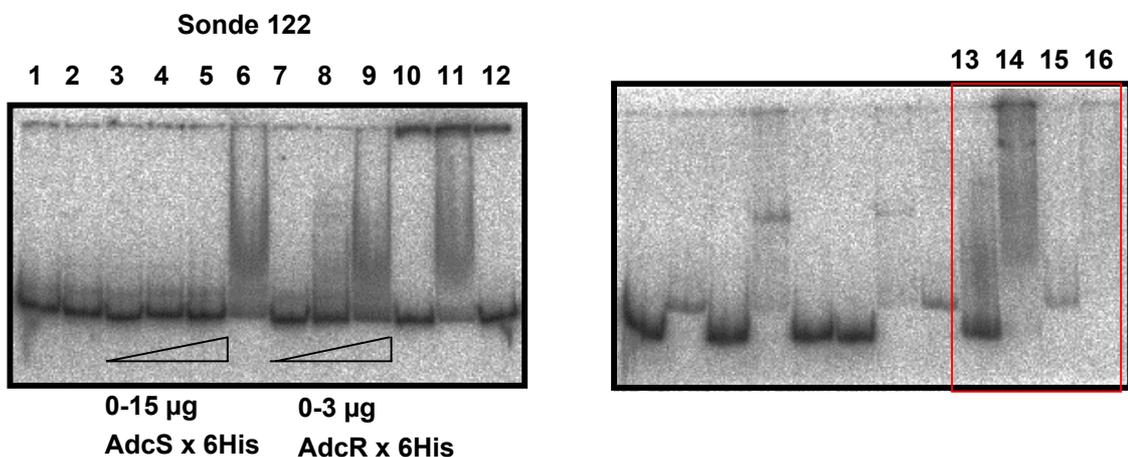
Für radioaktive Gelretardationsexperimente wurden zunächst die Sonden 121 und 122, wie beschrieben, über eine Standard-PCR unmarkiert hergestellt und anschließend über [ $^{32}\text{P}$ ]ATP direkt vor Gebrauch radioaktiv markiert. Eine geeignete Menge der jeweiligen Sonde (ca. 14000 cpm) wurde zusammen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen in einer Bindereaktion eingesetzt. Die Analyse erfolgte auch hier im nativen Polyacrylamidgel, die Detektion jedoch über Autoradiographie an einer 'BAS-MP Phosphor Imaging'-Platte.

Bei Inkubation der Sonde 121 bzw. 122 mit dem Fusionsprotein AdcR x 6His konnte, wie auch in Experimenten mit unmarkierter Sonde, eine Retardation der jeweiligen Sonde in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration gezeigt werden (**Abb. 32 und 33**). Auch hier zeigte sich jedoch, daß die Sonde zwar verschwand, daß ein eindeutiger Protein-DNA-Komplex aber nur schwer zu erkennen war. Wurde das Protein AdcR x 6His zusammen mit regulatorisch interessanten DNA-Sonden aus *C. glutamicum* inkubiert, so war bei einer Konzentration von 1 und 3 µg Protein (**Abb. 32, Spur 8; Abb. 33, Spur 13 und 15**) keine Retardation, bei einer Konzentration von 5 µg Protein jedoch eine Retardation zu erkennen (**Abb. 32, Spur 11; Abb. 33, Spur 14 und 16**). Eine Inkubation der Sonde 121 bzw. 122 mit zwei unterschiedlichen Transkriptionsregulatoren aus *C. glutamicum* (RamA und RamB) führte in keinem Fall zu einer Retardation (**Abb. 32, Spur 9 und 10; Abb. 33, Spur 1 und 2**). Die Sonden und Proteine aus *C. glutamicum* wurden von Annette Cramer zur Verfügung gestellt. Eine Retardation der Sonde 122 war nicht zu beobachten, wenn die Sonde mit verschiedenen Konzentrationen des Proteins AdcS x 6His inkubiert wurde (**Abb. 33, Spur 3-5**). Wurde die Sonde mit beiden Proteinen, AdcR x 6His und AdcS x 6His, inkubiert (**Abb. 33, Spur 6**), so entsprach die Retardation der verursacht durch eine Inkubation mit dem Protein AdcR x 6His allein. Gleiches galt auch für die Sonde 121 (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Vermutung, daß die Proteine AdcR x 6His und AdcS x 6His möglicherweise die Funktion eines Sigmafaktors einnehmen könnten, ließ sich nicht bestätigen. Eine Inkubation der Proteine mit der Sonde 121 bzw. 122 und dem RNA-Polymerase *core enzyme* führte zu identischen Ergebnissen wie bisher.



**Abb. 32** Radioaktive Gelretardationsexperimente mit gereinigtem Fusionsprotein AdcR x 6His und einem Transkriptionsregulator (RamB) aus *C. glutamicum*

1-3: 0/ 2/ 3 µg AdcR x 6His; 4-7: 0/ 1/ 2/ 3 µg AdcR x 6His; 8: Sonde aus *C. glutamicum* + 3 µg AdcR x 6His; 9: Sonde 122 + 3 µg Protein (RamB) aus *C. glutamicum*; 10: Sonde 122 + Protein (RamB) aus *C. glutamicum*; 11: Sonde aus *C. glutamicum* + 5 µg AdcR x 6His; 12: weitere Sonde aus *C. glutamicum* + 5 µg AdcR x 6His (Bei den Sonden aus *C. glutamicum* handelt es sich um regulatorisch interessante DNA-Bereiche dieses Bakteriums.)

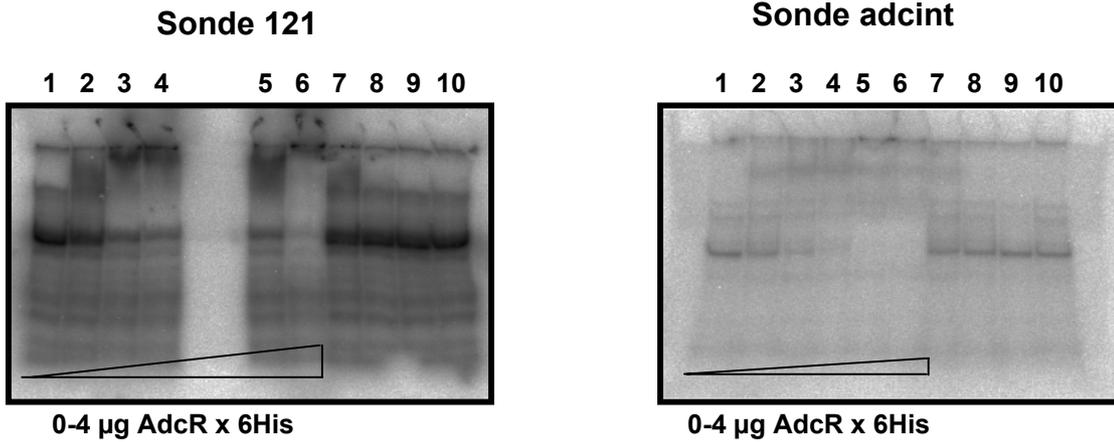


**Abb. 33** Radioaktive Gelretardationsexperimente mit gereinigtem Fusionsprotein AdcR x 6His, AdcS x 6His und zwei Transkriptionsregulatoren (RamA und RamB) aus *C. glutamicum*

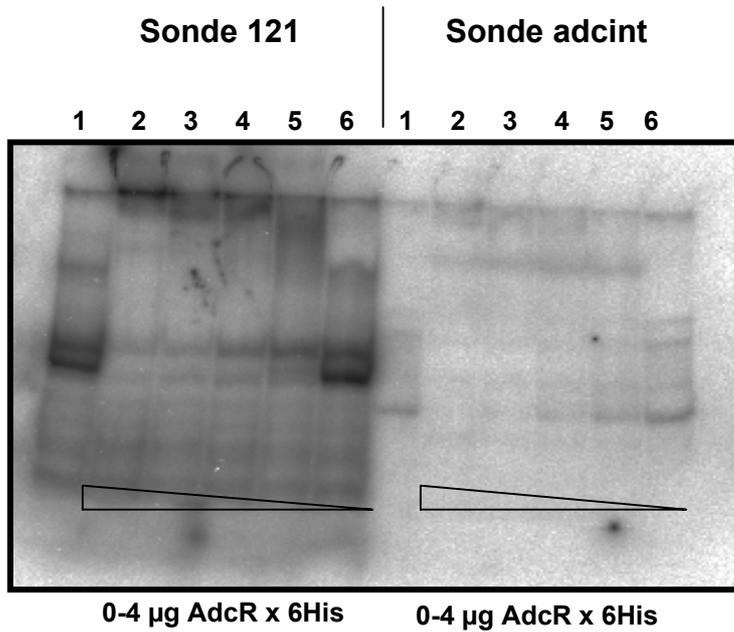
1: RamB aus *C. glutamicum*; 2: RamA aus *C. glutamicum*; 3-5: 0/ 5/ 15 µg AdcS x 6His; 6: 3 µg AdcR x 6His + 15 µg AdcS x 6His; 7-9: 0/ 1/ 3 µg AdcR x 6His; 10-12: RNA-Polymerase core enzyme, 10: 3 µg AdcS x 6His, 11: AdcR x 6His, 12: ohne Protein; 13: Sonde aus *C. glutamicum* + 1 µg AdcR x 6His; 14: Sonde aus *C. glutamicum* + 5 µg AdcR x 6His; 15: weitere Sonde aus *C. glutamicum* + 1 µg AdcR x 6His; 16: weitere Sonde aus *C. glutamicum* + 5 µg AdcR x 6His (Bei den Sonden aus *C. glutamicum* handelt es sich um regulatorisch interessante DNA-Bereiche dieses Bakteriums.)

Eine teilweise Wiederholung und Erweiterung der radioaktiven Gelretardationsexperimente brachte einige neue Erkenntnisse bezüglich des Verhaltens der Fusionsproteine AdcR x 6His und AdcS x 6His. Dazu wurden zum einen beide Fusionsproteine frisch gereinigt und direkt in den Experimenten eingesetzt, und zum anderen wurde eine weitere DNA-Sonde als Kontrolle verwendet. Diese DNA-Sonde, bestehend aus einer 227-Bp-langen Sequenz aus dem internen Bereich des Gens *adc*, wurde über eine Standard-PCR unter Verwendung der *Primer* *adcmi1* und *adcmi2* generiert. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte wie beschrieben. An diese Sonde sollte keines der Proteine eine Bindung zeigen, da die Sequenz dieser Sonde keine regulatorisch interessanten Elemente enthielt. Da bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte, daß sich die Sonden 121 und 122 in den durchgeführten Gelretardationsexperimenten entsprechend verhielten, wurde in den weiteren Experimenten lediglich mit der Sonde 121 gearbeitet. Die Analyse der verschiedenen Bindereaktionen ist in **Abb. 34** und **Abb. 35** dargestellt. Es zeigte sich erneut, daß die Sonde 121 in Abhängigkeit von der Konzentration des Fusionsproteins AdcR x 6His retardiert wurde. Die zum Nachweis einer Retardation minimal notwendige Proteinkonzentration betrug ca. 500 ng. Eine vollständige Retardation war bei einer Proteinkonzentration von ca. 4 µg zu beobachten. Die Angaben beziehen sich auf die eingesetzte Menge an Sonde von ca. 5 µg. In diesen Gelretardationsexperimenten war, im Gegensatz zu den vorherigen, eindeutig ein DNA-Protein-Komplex nachgewiesen worden, wenn die Konzentration des eingesetzten Fusionsproteins 2,5 µg nicht überschritt. Für die Sonde *adcint*, die als Negativkontrolle der DNA-Protein-Bindeexperimente eingesetzt wurde, waren die Ergebnisse dennoch nahezu entsprechend. Auch hier war eine Retardation der Sonde in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Fusionsproteins AdR x 6His zu beobachten. Für den Nachweis der Retardation war eine minimale Proteinkonzentration von ca. 250 ng ausreichend, eine vollständige Retardation wurde bei einer Proteinkonzentration von ca. 3,5 µg erreicht. Die eingesetzte DNA-Menge betrug im Fall der Sonde *adcint* jedoch nur ca. 3 ng, im Gegensatz zu 5 ng für die Sonde 121.

Für das Protein AdcR x 6His konnte damit eindeutig gezeigt werden, daß es konzentrationsabhängig an DNA bindet, eine Spezifität der Bindung war jedoch nicht nachweisbar. Auch lieferten die bisherigen Experimente noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse bezüglich des Verhaltens des Proteins AdcS x 6His. Möglicherweise könnte dieses Protein für die Spezifität der Bindung des Proteins AdcR x 6His verantwortlich sein. Weitere radioaktive Gelretardationsexperimente sollten deshalb durchgeführt und vor allem in bezug auf das Verhalten des Proteins AdcS x 6His hin betrachtet werden. Die Analyse der



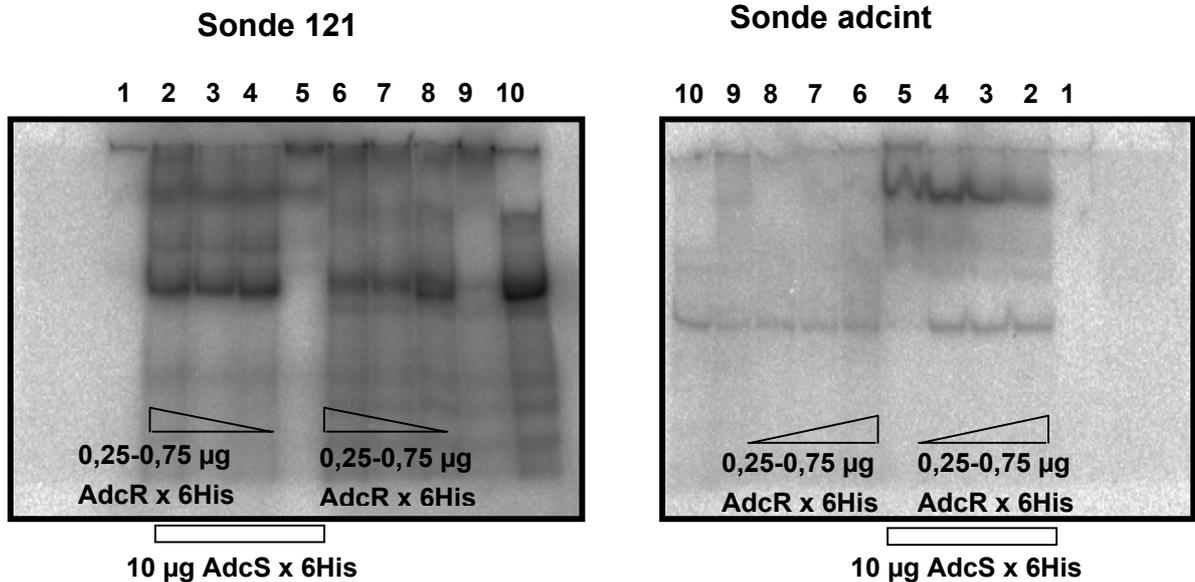
**Abb. 34** Radioaktive Gelretardationsexperimente mit gereinigtem Fusionsprotein AdcR x 6His  
 1-6: 0/ 0,5/ 1,5/ 2,5/ 3,5/ 4 µg Protein; 7: 0,25 µg Protein; 8: 0,1 µg Protein; 9: 0,05 µg Protein; 10: 0,025 µg Protein



**Abb. 35** Radioaktive Gelretardationsexperimente mit gereinigtem Fusionsprotein AdcR x 6His  
 1: 0,25 µg Protein; 2-6: 4/ 3/ 2/ 1/ 0 µg Protein;

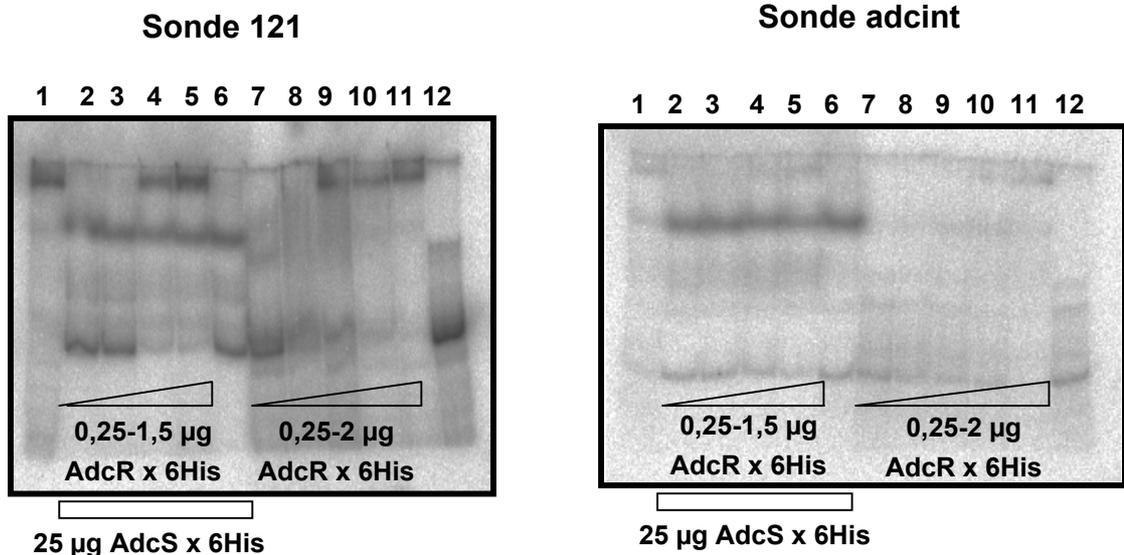
Experimente ist in der **Abb. 36** und der **Abb. 37** gezeigt. Erneut konnte bestätigt werden, daß die Retardation der Sonde 121 abhängig von der Konzentration des eingesetzten Fusionsproteins AdcR x 6His war. Die Retardation der Kontrollsonde *adcint* war in diesen Experimenten nicht so ausgeprägt, ein Hinweis, daß die Bindung des Fusionsproteins AdcR x 6His möglicherweise in einem definierten Konzentrationsbereich spezifisch sein könnte. Wurde das Protein AdcS x 6His im Überschuß allein in einer Bindereaktion mit der Sonde 121 bzw. der Sonde *adcint* eingesetzt, war in diesen Experimenten eine Retardation der eingesetzten DNA zu erkennen. Der dabei entstandene DNA-Protein-Komplex war deutlich zu erkennen und unterschied sich deutlich von dem Komplex, der zu beobachten war, wenn das Protein AdcR x 6His mit den entsprechenden Sonden inkubiert wurde. Wurden beide Proteine gemeinsam mit der Sonde 121 bzw. der Sonde *adcint* inkubiert, so waren in der Analyse der Bindereaktion beide für die einzelnen Proteine beschriebenen DNA-Protein-Komplexe zu beobachten, wobei im Fall der Kontrollsonde die Retardation schwächer ausgeprägt war. Einen Hinweis darauf, daß auch die Bildung des DNA-Protein-Komplexes, der bei dem alleinigen Einsatz des Proteins AdcS x 6His in Bindereaktionen entstand, konzentrationsabhängig war, zeigten die **Spuren 1** in **Abb. 37**. Hier wurden im Bindeansatz 2 µg des Proteins AdcR x 6His und 1,25 µg des Proteins AdcS x 6His eingesetzt und der Komplex, gebildet aus dem Fusionsprotein AdcR x 6His und der DNA, war schwächer ausgeprägt als bei dem Einsatz von 25 µg Protein. Eine Inkubation der Sonden mit Proteinrohextrakt, gewonnen aus Zellen, die das Protein AdcR x 6His überproduzieren, lieferte keine aussagekräftigen Ergebnisse, da erneut, wahrscheinlich durch vorhandene Nuklasen im Rohextrakt, die DNA und damit die Sonden zerstört wurden.

Zusammenfassend ergaben die Analysen der Gelretardationsexperimente, daß die Proteine AdcR x 6His und AdcS x 6His an die Promoterregion des *adc*-Gens banden, die Spezifität der Bindung blieb jedoch noch ungeklärt. Die Vermutung, daß das Protein AdcS x 6His für die Spezifität der Bindung des Proteins AdcR x 6His notwendig sein könnte, konnte mit den durchgeführten Experimenten weder bestätigt noch widerlegt werden.



**Abb. 36** Radioaktive Gelretardationsexperimente mit gereinigtem Fusionsprotein AdcR x 6His und AdcS x 6His

1: Rohextrakt; 2-4 und 6-8: 0,25/ 0,5/ 0,75 µg AdcR x 6His + 10 µg AdcS x 6His; 5,9: 2 µg AdcR x 6His; 10: Sonde ohne Protein

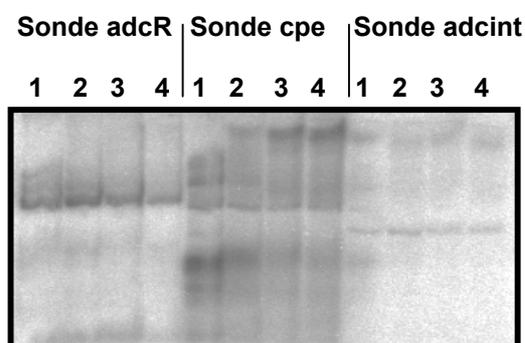


**Abb. 37** Radioaktive Gelretardationsexperimente mit gereinigtem Fusionsprotein AdcR x 6His und AdcS x 6His

1: 2 µg AdcR x 6His + 1,25 µg AdcS x 6His; 2-5: 0,25/ 0,5/ 1/1,5 µg AdcR x 6His + 25 µg AdcS x 6His; 6: 25 µg AdcS x 6His; 7-11: 0/ 0,25/ 0,5/ 1/ 1,5/ 2 µg AdcR x 6His; 12: Sonde ohne Protein

### 3.1.6.2 Untersuchung des *adcR*-Promoterbereichs

Die Sequenz stromaufwärts des Gens *adcR* läßt eine potentielle reverse Spo0A-Bindestelle (0A-Box) vermuten. Die Bindeeigenschaft des gereinigten Fusionsproteins Spo0A x 6His sollte deswegen in einem Gelretardationsexperiment untersucht werden. Die Methode der Wahl war, aus beschriebenen Gründen, die Verwendung von radioaktiv markierten Sonden und die Analyse der Bindereaktionen in einem nativen Polyacrylamidgel nach Autoradiographie an einer 'BAS-MP Phosphor Imaging-Platte'. Die Bindung des Fusionsproteins Spo0A x 6His an den *adcR*-Promoterbereich wurde mit Hilfe der Sonden *adcR*, *cpe* und *adcint* untersucht. Die Herstellung der Sonden erfolgte dabei, wie beschrieben, unter Anwendung einer Standard-PCR und anschließender Markierung der DNA-Fragmente mit [<sup>32</sup>γ]ATP. Die Herstellung der Sonde *adcR* erfolgte über die *Primer* *adcRup* und *adcRrev*, und die *cpe*-Sonde wurde von Gunnar Box zur Verfügung gestellt. Die Sonde *adcint* diente, wie bereits in den vorherigen Gelretardationsexperimenten, als Negativkontrolle, da die zugehörige Sequenz keine regulatorisch relevanten Elemente enthielt. Die Sonde *cpe* diente als Positivkontrolle, da diese Sequenz aus dem Promoterbereich des *cpe*-Gens drei 0A-Boxen enthielt und für diesen Bereich bereits nachgewiesen wurde, daß Spo0A in der Lage ist, dort zu binden. Die Analyse der Bindereaktionen (**Abb. 38**) zeigte, daß das Fusionsprotein wie erwartet an die Promoterregion des *cpe*-Gens, die drei 0A-Boxen umfaßte, binden konnte und daß eine Bindung an die Sonde *adcint* nichtmöglich war. Eine Bindung von Spo0A an die Promoterregion des *adcR*-Gens ist anzunehmen, da eine leichte Retardation der Sonde *adcR* zu beobachten war. Weitere Experimenten sind jedoch notwendig, um diesen Befund zu überprüfen und genauer zu charakterisieren.



**Abb. 38** Radioaktive Gelretardationsexperimente mit gereinigtem Fusionsprotein Spo0A x 6His

1: ohne Protein; 2: 0,4 µg Protein; 3: 0,8 µg Protein; 4: 1,2 µg Protein

## 3.2 Untersuchungen zur Regulation des *sol*-Operons

### 3.2.1 Allgemeine Betrachtung des Hefe-Ein-Hybrid-Systems (*yeast one-hybrid system*)

Für die Untersuchung von DNA-Protein Interaktionen stehen diverse Methoden zur Verfügung. Dazu gehören Gelretardations-, DNaseI *Footprinting*- und Immuno-präzipitationsexperimente. Eine weitere Möglichkeit stellt das Hefe-Ein-Hybrid-System (*yeast one-hybrid system*, Y1H) dar. Das Hefe-Ein-Hybrid System ist eine Abwandlung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems (*yeast two-hybrid system*, Y2H), das Anfang der 90er Jahre von Fields und Song (1989) entwickelt wurde, um *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren. Das Prinzip des Y2H-Systems beruht auf der Verwendung von zwei Hybrid-Proteinen, dem sog. *bait* (engl. Köder) -Hybrid und dem sog. *prey* (engl. Beute) -Hybrid. Das *bait*-Hybrid setzt sich zusammen aus einem Protein X und einer DNA-Bindedomäne, das *prey*-Hybrid dagegen aus einem Protein Y und einer transkriptionellen Aktivierungsdomäne. Bei Interaktion der Proteine X und Y wird die Aktivierungs-domäne in räumliche Nähe zur DNA-Bindedomäne gebracht und aktiviert die Transkription eines angrenzenden Promoters eines Reportergens. Im Fall des Y1H-Systems wird nur ein Hybrid-Protein, das *prey*-Hybrid, verwendet. Interagiert das mit der Aktivator-domäne fusionierte Protein mit der vor ein Reportergen klonierten DNA-Sequenz, so wird die Aktivierungsdomäne in die Nähe des Promoters des Reportergens gebracht und aktiviert diesen. Die Methode des Hefe-Ein- bzw. Zwei-Hybrid-Systems wurde in den letzten Jahren stetig weiter entwickelt. Die Systeme sind heute bei verschiedenen Herstellern kommerziell zu erwerben. Vor allem die Entwicklung bakterieller Zwei- (Karimowa et al., 1998; Kronacker et al., 1998; Joung et al., 2000; Hu et al., 2000) und Ein- (Hu et al., 2000; Meng et al., 2005) Hybrid-Systeme machte große Fortschritte. Gegenüber den Hefe-Systemen bieten die bakteriellen Systeme, im allgemeinen basierend auf *E. coli* als Wahlorganismus, einige Vorteile (Joung et al., 2000). Mit den bakteriellen Systemen kann eine größere Anzahl von Interaktionen in einer kürzeren Zeit getestet werden, was in einem schnelleren Wachstum und einer höheren Transformationseffizienz ( $10^9$  bei *E. coli* gegenüber  $10^6$  bei Hefen) begründet ist. Zudem wird in bakteriellen Systemen das Problem umgangen, daß prokaryotischen Proteinen typische, in Bakterien vorhandene, Cofaktoren fehlen, die für eine Interaktion notwendig sind. Das Problem, daß eukaryotische Proteine, aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu hefe-eigenen Proteinen, in den Stoffwechsel der Hefezellen eingreifen oder toxisch wirken, besteht in bakteriellen Systemen ebenfalls nicht.

### 3.2.2 Anwendung des Hefe-Ein-Hybrid-Systems auf den Promoterbereich des *sol*-Operons und das Protein Spo0A

Mit dem Hefe-Ein-Hybrid-System, 'MATCHMAKER One-Hybrid System', vertreten von der Firma CLONTECH Laboratories GmbH (Heidelberg), sollte die Bindung des Transkriptionsregulators Spo0A an die Promoterregion des *sol*-Operons untersucht werden.

Die *bait*-Sequenz, d. h. die Sequenz, an die das *prey*-Hybrid binden sollte, bildete in diesem Fall eine Sequenz aus der Promoterregion des *sol*-Operons. Das *prey*-Hybrid setzte sich für die Untersuchung der Bindung von Spo0A aus dem Spo0A-Protein und der Aktivatorodomäne zusammen. Die Klonierung, sowohl der *bait*-Sequenz als auch der Sequenz für die Herstellung des *prey*-Hybrids, erfolgte in dafür vorgesehenen Plasmiden. Das die *bait*-Sequenz-tragende Plasmid wurde als lineares Plasmid in die Hefe *S. cerevisiae* YM4271 transformiert und dort in das Chromosom integriert. Das Plasmid mit der *prey*-Hybrid-Sequenz wurde anschließend circular in den entsprechenden rekombinanten Hefestamm übertragen. Das Ausgangsplasmid für die Konstruktion des *prey*-Hybrid-Sequenz-tragenden Plasmids war das Plasmid pGAD424 (Bartel et al., 1993, **Abb. 39**). pGAD424 codiert für die Aktivierungsdomäne (AD) des Hefe GAL4-Trans-

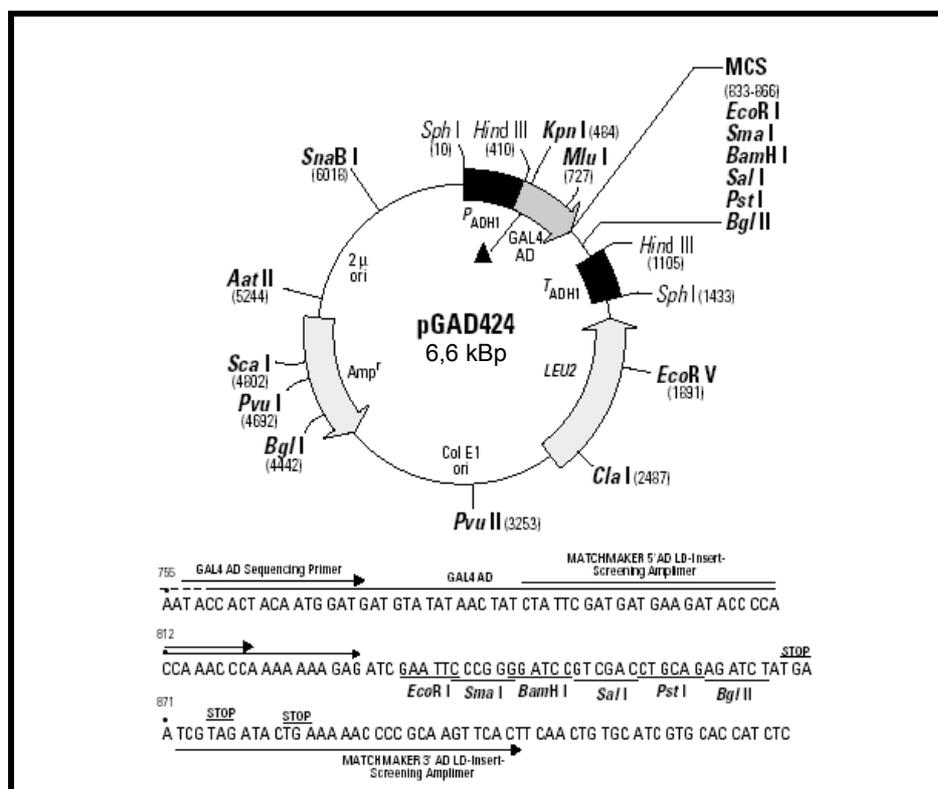


Abb. 39

**Restriktionskarte und Multiple Klonierungsstelle (MCS, multiple cloning site) des Plasmids pGAD424**

(Erklärung siehe Text) (<http://orders.clontech.com/clontech/techinfo/vectors>)

Einfach schneidende Enzyme sind fett dargestellt.

kriptionsaktivators. Der veränderte *ADH1*-Promoter war verantwortlich für eine niedrige Expression der Aktivierungsdomäne in der Hefezelle. Das Plasmid trug außerdem das *LEU2*-Gen für die Selektion in dem *LEU*-negativen Hefestamm *S. cerevisiae* YM4271. Die Integration der Sequenz des Transkriptionsregulators Spo0A erfolgte in die Multiple Klonierungsstelle (MCS). Dazu wurde das *spo0A*-Gen über eine Standard-PCR unter Verwendung der Primer *spo0A*-Mal EcoRI und *spo0A*-Mal-PstI generiert. Das EcoRI-PstI-verdaute DNA-Fragment wurde anschließend in entsprechend verdautes pGAD424-Plasmid kloniert. Die Klonierung war erfolgreich. Das *orf5*-Gen (Primer *orf5*-S-2Hy und *orf5*-E-2Hy) aus *C. acetobutylicum* wurde entsprechend dem *spo0A*-Gen in das Plasmid pGAD424 kloniert. Auch diese Klonierung war erfolgreich. Das Plasmid sollte als Negativkontrolle dienen, da das Protein Orf5 nachgewiesen nicht in der Lage ist, an die Promoterregion des *sol*-Operons zu binden (Thormann, 2001). Die *bait*-Sequenz wurde in drei unterunterschiedliche Plasmide kloniert. Zwei der Plasmide trugen das Reportergen *HIS3* (pHISi, pHISi-1, **Abb. 40 und 41**), das dritte das *lacZ*-Reportergen (pLacZi, **Abb. 42**). Die Herstellung der *bait*-Sequenz erfolgte über die

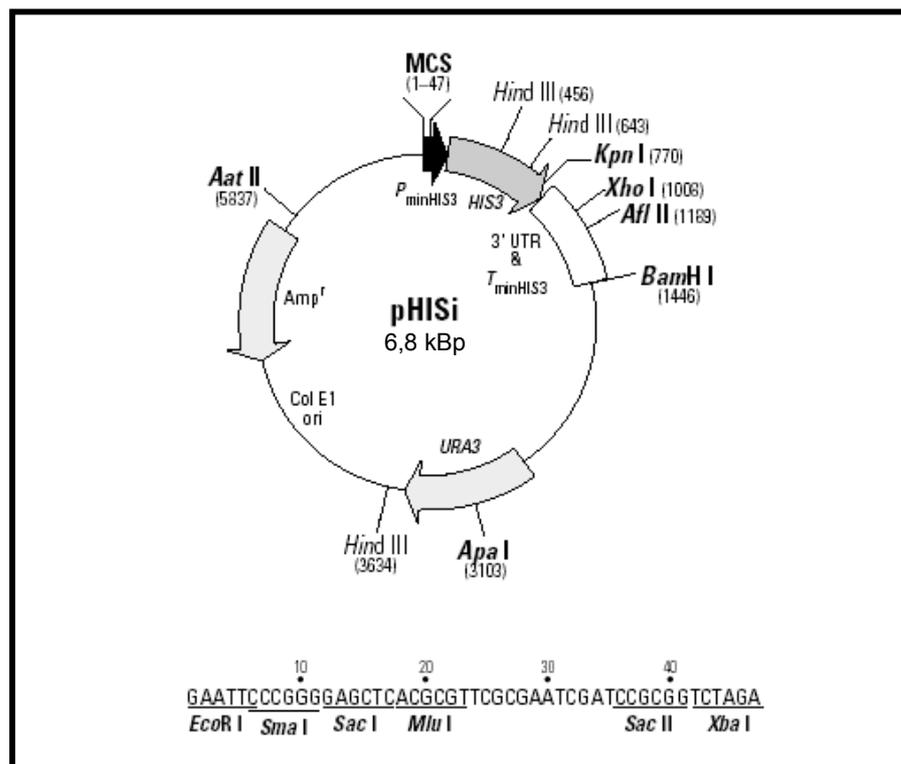
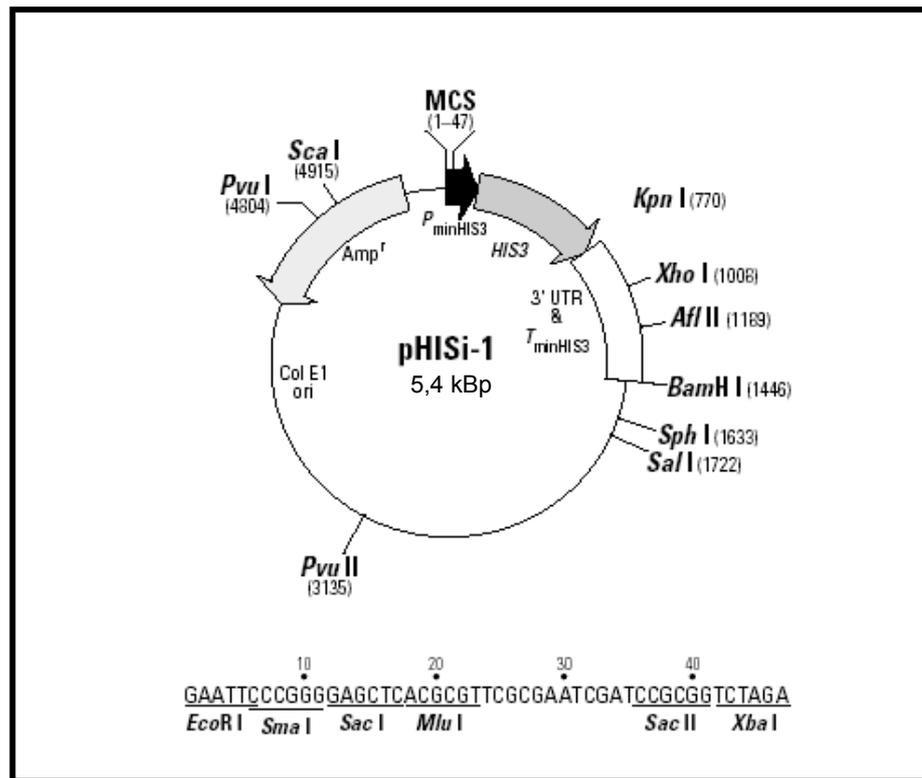


Abb. 40

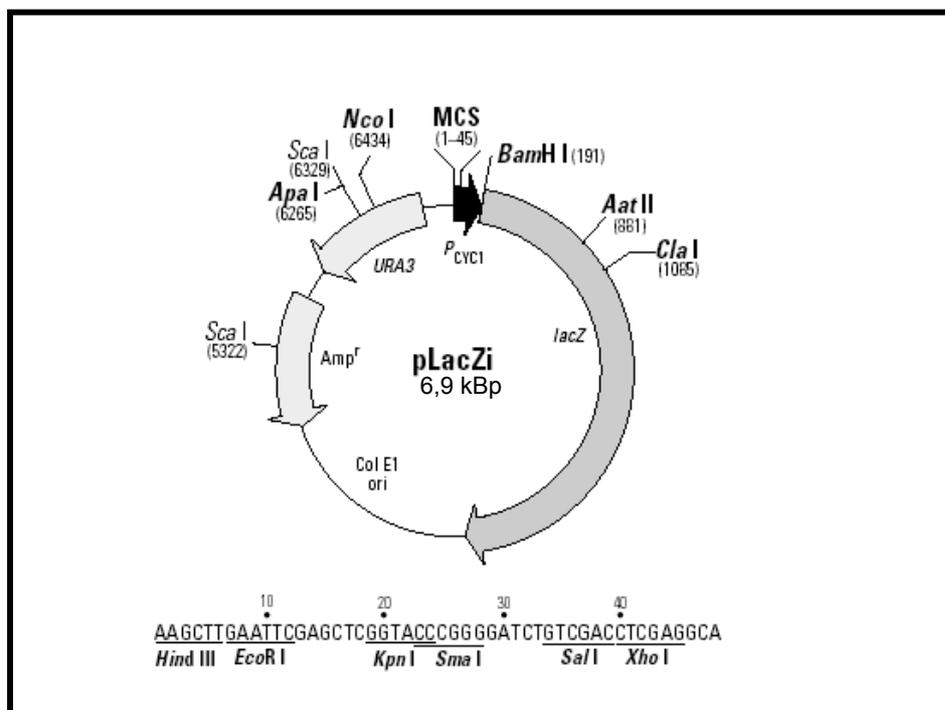
### Restriktionskarte und Multipleklonierungsstelle (MCS, *multiple cloning site*) des Plasmids pHISi

(Erklärung siehe Text) (<http://orders.clontech.com/clontech/techinfo/vectors>)

Einfach schneidende Enzyme sind fett dargestellt.



**Abb. 41** Restriktionskarte und Multiple Klonierungsstelle (MCS, multiple cloning site) des Plasmids pHISi  
 (Erklärung siehe Text) (<http://orders.clontech.com/clontech/techinfo/vectors>)  
 Einfach schneidende Enzyme sind fett dargestellt.



**Abb. 42** Restriktionskarte und Multiple Klonierungsstelle (MCS, multiple cloning site) des Plasmids pLacZi  
 (Erklärung siehe Text) (<http://orders.clontech.com/clontech/techinfo/vectors>)  
 Einfach schneidende Enzyme sind fett dargestellt.

Hybridisierung der komplementären *Primer* spo0A-BS1 und spo0A-BS3, die jeweils eine Länge von 33 Bp aufwiesen. Die Hybridisierung erfolgte derart, daß jeweils 2 µl Oligonukleotid (50 pmol/µl), was jeweils einer Konzentration von ca. 0,1 µg DNA entsprach, mit 10 µl NaCl (50 mM) für 5 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert wurden. Das Wasserbad wurde anschließend abgeschaltet und der Ansatz darin für weitere 15 min inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine weitere Inkubation des Ansatzes bei RT, bis er vollständig abgekühlt war. 3 µl des Hybridisierungsprodukts wurden anschließend einem *EcoRI-SmaI*-Verdau unterzogen und direkt in eine Ligation mit ebenso verdautem Vektor pHISi, pHISi-1 bzw. pLacZi eingesetzt. Die Klonierung der *bait*-Sequenz war für alle drei Plasmide erfolgreich. Die entstandenen Plasmide erhielten die Bezeichnungen pHISi/BD, pHISi-1/BD und pLacZi/BD.

Für Kontrollexperimente wurden das Plasmid pGAD53m sowie die Plasmide p53HIS und p53BLUE verwendet, die vom Hersteller zur Verfügung gestellt wurden. Das Plasmid pGAD53m trug das aus der Maus stammende Gen *p53* und das die Aktivierungsdomäne codierende Gen. Die Plasmide p53HIS und p53BLUE trugen die Sequenz der Bindestelle des Genprodukts *p53* und jeweils die Sequenz des Reportergens *HIS3* bzw. *lacZ*.

Die drei *bait*-Sequenz tragenden Plasmide pHISi/BD, pHISi-1/BD und pLacZi/BD sowie die Kontrollplasmide p53HIS und p53BLUE wurden linearisiert und in *S. cerevisiae* YM4271 transformiert. Die Linearisierung der Plasmide pHISi/BD, pHISi-1/BD und p53HIS erfolgte durch einen Schnitt mit dem Enzym *XhoI*, die der Plasmide pLacZi/BD bzw. p53BLUE mit einem Schnitt durch das Enzym *NcoI*. Für die Transformation in *S. cerevisiae* wurden 1-4 µg jedes linearisierten und mit Hilfe des 'NucleoSpin Extract Kit' gereinigten Plasmids eingesetzt. Die transformierten Hefezellen wurden auf den entsprechenden SD-Minimalmedium-Platten zur Selektion der Transformanten, die das Plasmid ins Chromosom integriert trugen, ausplattiert. In **Tab. 15** sind die entsprechenden Selektionsmedien aufgeführt. Die Integration der Plasmide pHISi/BD, pHISi-1/BD und p53HIS führte in der Histidin-auxotrophen Hefe *S. cerevisiae* zur Wiederherstellung der Fähigkeit, auf Minimalmedium ohne Histidin-Zusatz zu wachsen, die Integration der Plasmide pLacZi/BD und p53BLUE ermöglichten das Wachstum der Uracil-auxotrophen Hefe auf Minimalmedium ohne Uracil-Zusatz.. Erfolgte keine Integration der Plasmide in das Chromosom, so gingen sie verloren, da sie nicht in der Lage waren, in der Hefe zu replizieren. Die Integration war für die Plasmide p53HIS, p53BLUE, pHISi/BD und pLacZi/BD erfolgreich. Die Integration des Plasmids pHISi-1/BD blieb, auch nach mehreren Versuchen, erfolglos. Die Stämme *S. cerevisiae* YM4721 [p53HIS], *S. cerevisiae* YM4721 [p53BLUE], *S. cerevisiae* YM4721 [pHISi/BD] und *S. cerevisiae* YM4721 [pLacZi/BD] standen nun für weitere

Tab. 15 Reporterplasmide

	p53HIS	p53BLUE	pHISi/BD	pHISi-1/BD	pLacZi/BD
Reportergergen	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>
Linearisierungsenzym	<i>XhoI</i>	<i>NcoI</i>	<i>XhoI</i>	<i>XhoI</i>	<i>NcoI</i>
Integrationsort	<i>his</i>	<i>ura</i>	<i>his</i>	<i>his</i>	<i>ura</i>
Hefe- Selektionsmedium	SD/-His	SD/-Ura	SD/-His	SD/-His	SD/-Ura

Untersuchungen zur Verfügung. Bevor mit der Transformation des Plasmids, das für das *prey*-Hybrid codierte, fortgefahren werden konnte, mußte mit Hilfe zweier Tests die Hintergrundaktivität der jeweiligen Reporterstämme getestet werden.

Im Falle der Reporterstämme mit dem Reportergergen *lacZ* (*S. cerevisiae* YM4721 [pLacZi/BD], *S. cerevisiae* YM4721 [p53BLUE]) wurde dafür ein  *$\beta$ -galactosidase colony-lift filter assay* durchgeführt. Im Falle der Reporterstämme *S. cerevisiae* YM4721 [p53HIS] und *S. cerevisiae* YM4721 [pHISi/BD] wurde die 3-AT-Konzentration bestimmt, bei der der jeweilige Stamm die wenigsten Kolonien auf einer SD-Medium-Selektionsplatte bildete. 3-AT hemmt die Expression des *HIS3*-Gens. Der  *$\beta$ -galactosidase colony-lift filter assay* verfärbte sich für beide Stämme erst nach einer Inkubationszeit von mehr als 15 min, was zeigte, daß die Stämme als Reporterstämme geeignet waren. Die notwendige 3-AT-Konzentration für den Stamm *S. cerevisiae* YM4721 [p53HIS] betrug 45 mM, für den Stamm *S. cerevisiae* YM4721 [pHISi/BD] mußte die Konzentration auf 60 mM 3-AT erhöht werden.

Der nächste Schritt bestand in der Transformation der verschiedenen Stämme mit den Plasmiden pGAD424/spo0A, pGAD424/orf5, pGAD53m bzw. pGAD424. Eine erfolgreiche Transformation sollte dazu führen, daß die jeweiligen Stämme wieder in der Lage sind auf SD-Medium ohne Leucin zu wachsen, da die Plasmide pGAD424/spo0A, pGAD424/orf5 und pGAD53m das *LEU2*-Gen trugen.

Zunächst erfolgte jedoch die Transformation der Kontrollstämme *S. cerevisiae* [p53HIS] und *S. cerevisiae* [p53 BLUE] jeweils mit den Plasmiden pGAD53m und pGAD424. Die Ergebnisse dieser Transformation sind in **Tab. 16** zusammengefaßt. Der *HIS3*-Reportergergen-tragende Stamm war nach der Transformation mit den Plasmiden pGAD424 bzw. pGAD53m in der Lage, auf Minimal-medium ohne Histidin und/oder ohne Leucin zu wachsen, was für eine erfolgreiche Transformation sprach. Ein Wachstum ohne Leucin war nur möglich, wenn die Plasmide pGAD424 bzw. pGAD53m, die das *LEU2*-Gen trugen, übertragen wurden. Das wiederhergestellte Wachstum ohne Histidin-Zusatz sprach dafür, daß das bereits durch die Integration des Plasmid p53HIS reparierte *HIS3*-Gen aktiv war. Dafür verantwortlich war die bereits angesprochene Hintergrundaktivität des ent-

Tab. 16 Kontrollexperimente des Hefe-Ein-Hybrid-Systems

Integriertes Reporterplasmid	Transformiertes Plasmid	SD-Selektionsmedium	Ergebnis
p53HIS	pGAD424	-His	viele große Kolonien
p53HIS	pGAD424	-Leu	viele große Kolonien
p53HIS	pGAD53m	-Leu/-His/+60mM 3-AT	viele große Kolonien
p53HIS	pGAD424	-Leu/-His/+60mM 3-AT	keine Kolonien
p53BLUE	pGAD53m	-Leu	viele große Kolonien
p53BLUE	pGAD424	-Leu	viele große Kolonien

sprechenden Gens. Wurde die Hintergrundexpression durch die Zugabe von 3-AT minimiert, so war, wie erwartet, im Fall von *S. cerevisiae* [p53HIS][pGAD424] kein Wachstum zu beobachten, da das Reporter-gen nicht aktiviert wurde. Wurde der Stamm *S. cerevisiae* [p53HIS] dagegen mit dem Plasmid pGAD53m transformiert, das die Sequenz des Bindeproteins und die Sequenz der Aktivierungsdomäne trug, wodurch die Expression des Reporter-gens möglich war, so war ein Wachstum zu beobachten. Für den Stamm, der das *lacZ*-Reporter-gen trug (*S. cerevisiae* YM4271[p53BLUE]), galt in Bezug auf die Leucin-Auxotrophie entsprechendes wie für die Stämme, die das *HIS3*-Gen als Reporter-gen trugen. Die Kolonien des Reporter-stammes *S. cerevisiae* YM4271[p53BLUE], nach der Transformation mit dem Plasmid pGAD424 bzw. pGAD53m, wurden in einem *β-galactosidase colony-lift filter assay* untersucht. Bei einer Transformation mit pGAD424 konnte keine Verfärbung nach blau beobachtet werden, bei einer Transformation mit pGAD53m erfolgte nach 30 min eine Verfärbung. Auch hier wurde die Expression des Reporter-gens durch das Vorhandensein des Bindeproteins und der Aktivierungsdomäne induziert. Beide Reporter-gen-tragenden Stämme waren demnach, wie die Kontrollen eindeutig zeigten, für die Anwendung geeignet. Die Experimente zur Untersuchung der Bindung von Spo0A wurden durchgeführt und sind in **Tab. 17** zusammengefasst. Im Falle jeder in **Tab. 17** dargestellten Transformation waren Kolonien gewachsen. Für die Stämme mit dem *HIS3*-Gen als Reporter-gen war die Transformation in allen drei Fällen erfolgreich, da ein Wachstum auf einem Minimalmedium, dem Leucin fehlte, nur möglich war, wenn das *LEU2*-Gen durch das entsprechende Plasmid übertragen wurde. Auch auf einem Medium, dem Leucin und Histidin fehlten und dem zusätzlich 3-AT in entsprechender Konzentration zugesetzt wurde, war in allen Fällen ein Wachstum zu beobachten. Da dies auch für die Negativkontrollen (*S. cerevisiae* [pHISi/BD][pGAD424] und *S. cerevisiae* [pHISi/BD][pGAD424/orf5]) zutrifft, war keine Aussage bezüglich des Stammes *S. cerevisiae* [pHISi/BD][pGAD424/spo0A], und damit der Bindung des Proteins Spo0A an die

Tab. 17 Untersuchung der Bindung von Spo0A im Hefe-Ein-Hybrid-System

Integriertes Reporterplasmid	Transformiertes Plasmid	SD-Selektionsmedium	Ergebnis
pHISi/BD	pGAD424	-Leu/-His/+60 mM 3-AT	Kolonien
pHISi/BD	pGAD424/orf5	-Leu/-His/+60 mM 3-AT	Kolonien
pHISi/BD	pGAD424/spo0A	-Leu/-His/+60 mM 3-AT	Kolonien
pLacZi/BD	pGAD424	-Leu	Kolonien
pLacZi/BD	pGAD424/orf5	-Leu	Kolonien
pLacZi/BD	pGAD424/spo0A	-Leu	Kolonien

Tab. 18 Enzymatische Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

<i>S. cerevisiae</i> -Stamm	$\beta$ -Galactosidase-Aktivität (U/ml)
[p53BLUE][pGAD424]	0,008
[p53BLUE][pGAD53m]	0,540
[pLacZi/BD][pGAD424]	0,002
[pLacZi/BD][pGAD424/spo0A]	0,001
[pLacZi/BD][pGAD424/orf5]	0,002

die *bait*-Sequenz, möglich. Im Fall des *lacZ*-Gens als Reportergen war die Transformation ebenfalls in allen drei Fällen erfolgreich. Wurden die Kolonien der Transformation unter Anwendung eines  *$\beta$ -galactosidase colony-lift filter assay* untersucht, so waren in allen Fällen blaue Kolonien zu erkennen. Da sich der Stamm *S. cerevisiae* [pLacZi/BD][pGAD424/spo0A] wie der Stamm *S. cerevisiae* [pLacZi/BD][pGAD424] und der Stamm *S. cerevisiae* [pLacZi/BD][pGAD424/orf5] verhielt, und es sich bei den beiden erstgenannten um Negativkontrollen handelte, mußte angenommen werden, daß das Spo0A-Protein nicht mit der *bait*-Sequenz interagiert. Um sicher zu gehen, wurde jedoch zusätzlich die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität aller drei Stämme enzymatisch im Photometer untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tab. 18** zusammengefaßt. Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten der Kontrollen zeigten deutlich, daß das Hefe-Ein-Hybrid-System prinzipiell funktionierte. Da außer dem Stamm, der als Positivkontrolle mitgeführt wurde (*S. cerevisiae* [p53BLUE][pGAD53m]), kein Stamm eine signifikante  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität aufwies, mußte davon ausgegangen werden, daß das Protein Spo0A nicht an die *bait*-Sequenz, d. h. an die Promotersequenz des *sol*-Operons, gebunden hatte.

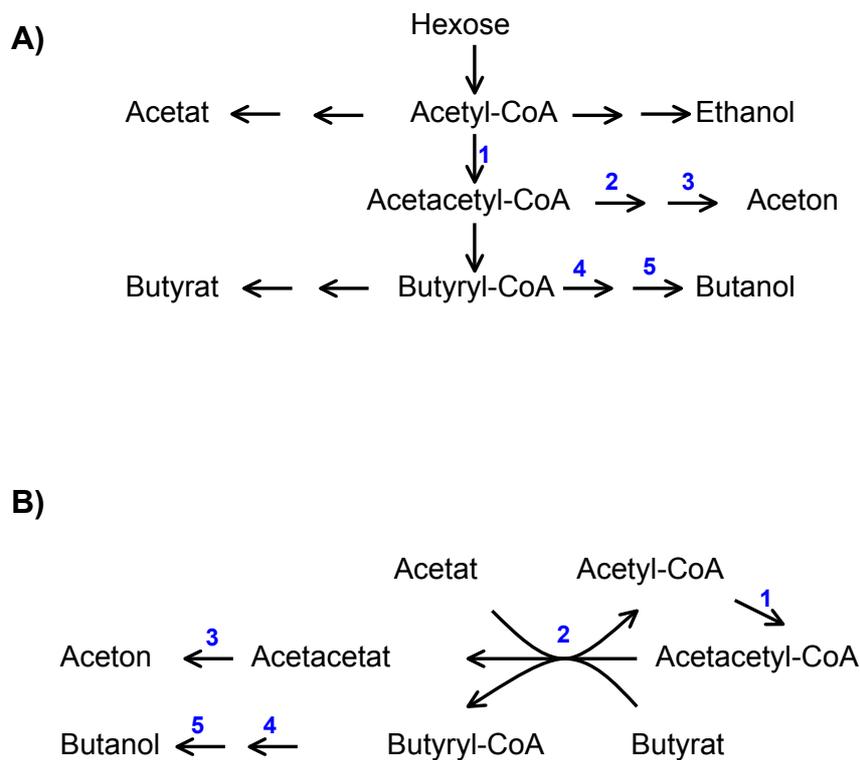
## 4. Diskussion

### 4.1 Lösungsmittelbildung in *Clostridium acetobutylicum*

Die Lösungsmittel Aceton und Butanol werden seit 1950 hauptsächlich über chemische Verfahren hergestellt: Aceton über das Cumolhydroperoxidverfahren oder über die Dehydrierung bzw. Oxidehydrierung von Isopropanol und Butanol über die Hydroformylierung von Propen mit einer daran anschließenden Hydrierung. Da die chemischen Verfahren jedoch auf die in den letzten Jahren im Preis sehr stark gestiegenen (**Abb. 3**) und vor allem begrenzten Erdölressourcen angewiesen sind, wird es nur eine Frage der Zeit sein, bis biologische Verfahren der Aceton- und Butanolproduktion mit Hilfe von Mikroorganismen die chemischen Verfahren ersetzen werden. Zahlreiche Clostridien sind natürliche Produzenten der Lösungsmittel Aceton, Butanol und auch Isopropanol, wobei *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* die Hauptproduzenten darstellen (Keis et al., 1995; 2001a; 2001b). Durch den derzeitigen Vorsprung der chemischen Industrie bei der Erzeugung der Lösungsmittel, bedingt vor allem durch die geringen Ausbeuten des mikrobiologischen Prozesses, ist es von vorrangigem Interesse, wirtschaftliche Mengen der Produkte Aceton und Butanol zu erzeugen. Daneben könnte auch das ebenfalls während der Gärung anfallende Acetoin (Andersch et al., 1982; Bahl et al., 1982; Reardon und Bailey, 1988; Bunday et al., 1989) ein nicht zu unterschätzendes Produkt sein, da es in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksstoff eingesetzt wird. So eindeutig die Funktion der meisten Gene und Genprodukte in der Lösungsmittelbildung auch ist, so wenig bekannt sind die zugehörigen Regulationsmechanismen, was als Hauptursache dafür angesehen werden kann, daß eine signifikante Steigerung der Ausbeute der Lösungsmittel bisher noch nicht erreicht wurde. Die Aufklärung der Regulationsvorgänge der Lösungsmittelbildung von *C. acetobutylicum* stellt deshalb ein zentrales Thema der Forschung dar. Lange Zeit wurde dieses Ziel mit Hilfe von physiologisch-chemischen Untersuchungen verfolgt, verlagert sich aber dann zunehmend in Richtung molekularbiologischer Ansätze, weswegen letztere auch Grundlage der vorliegenden Arbeit sind. Die Untersuchungen konzentrieren sich dabei auf die Promoterbereiche der Transkriptionseinheiten *sol*- und *adc*-Operon, die als Hauptangriffsstellen der Regulation bekannt sind.

## 4.2. Das monocistronische *adc*-Operon

Das monocistronisch organisierte *adc*-Gen (**Abb. 4**) codiert das an der Acetonbildung beteiligte Enzym Acetacetat-Decarboxylase (Adc), welches bereits vor mehr als 30 Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten war (Westerheimer, 1969; Fridovich, 1972). Das Enzym besteht aus 12 identischen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 330 kDa (28 kDa je Untereinheit) (Gerischer und Dürre, 1990; Petersen und Bennett, 1990). Im biphasischen Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* katalysiert die Acetacetat-Decarboxylase den letzten Schritt der Bildung von Aceton, die Decarboxylierung des durch die Aktivität der CoA-Transferase (Ctf) bereitgestellten Acetacetats (**Abb. 43**). Die CoA-Transferase wird durch die Gene *ctfA* und *ctfB* codiert, die auf dem polycistronischen *sol*-Operon, das weiterhin die Gene *adhE* und *orfL* enthält (**Abb. 4**), lokalisiert sind. Die monocistronische Organisation des *adc*-Gens sowie der Besitz eines *adhE*-Gens ist spezifisch für den Stamm *C. acetobutylicum*. In den übrigen Lösungsmittelbildenden Clostridien ist das *adc*-Gen Teil des *sol*-Operons, das in diesen Fällen aus den beiden Genen *ald*, *ctfA*, *ctfB* und *adc* besteht (Toth et al., 1999; Jones, 2002). *ald* codiert eine Aldehyd-Dehydrogenase. Eine weitere Besonderheit in *C. acetobutylicum* ist das Vorkommen eines zweiten *adhE*-Gens (*adhE2*). *C. acetobutylicum* repräsentiert damit bis jetzt den einzigen Organismus, der zwei derartige Gene aufweist. Eine Gesamtübersicht über die Intermediate, Endprodukte und die wichtigsten Enzyme des biphasischen Gärungsstoffwechsels ist in **Abb. 43A**) gegeben. **Abb. 43B**) erklärt die zunächst unverständlich erscheinende getrennte Lage der Gene *adc*, *ctfA* und *ctfB* auf zwei verschiedenen Operonen, trotz der Notwendigkeit der entsprechenden Genprodukte für die Bildung von Aceton. Unter physiologischen Bedingungen werden die Säuren Acetat und Butyrat beim Eintritt in die Solventogenese durch die Aktivität der CoA-Transferase hauptsächlich in Butyryl-CoA umgewandelt (Rogers, 1986), welches wiederum durch die Aktivität der Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase E zu Butanol umgesetzt wird. Die Anordnung der entsprechenden Gene, *ctfA*, *ctfB* und *adhE* in einem Operon (*sol*-Operon) ist demnach effizient. Die Decarboxylierung des Intermediats Acetacetat und damit verbunden die Bildung von Aceton ist nur notwendig, wenn nicht ausreichend Reduktionsäquivalente für die Reduktion von Butyryl-CoA und Butyrylphosphat zur Verfügung stehen. In diesem Fall muß die Acetacetat-Decarboxylase durch die Entfernung des Acetacetats die thermodynamisch ungünstige CoA-Transferase-Reaktion antreiben (Dürre et al., 1995). In Bezug auf die Bildung der Lösungsmittel bedeutet das, daß je nach verwendetem Substrat bis zu 50fach mehr Butanol als Aceton gebildet werden kann (Bahl et al., 1986). Bei der Aufklärung regulatorischer Mechanismen der



**Abb. 43 Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum***

(in Anlehnung an Dürre et al., 1995)

**A) allgemein gebräuchliches Schema**

**B) einleitende Schritte der Lösungsmittelbildung**

1: Thiolase; 2: CoA-Transferase; 3: Acetacetat-Decarboxylase; 4: Butyraldehyd-Dehydrogenase Domäne der AdhE; 5: Butanol-Dehydrogenase Domäne der AdhE und Butanol-Dehydrogenase A und B

Lösungsmittelbildung sind die dargelegten Besonderheiten in der genetischen Organisation vom *C. acetobutylicum* von entscheidender Bedeutung.

### 4.3 Regulation des *adc*-Operons

Mit einem Anteil von 1,1 % an der Gesamtproteinsynthese ist die Acetacetat-Decarboxylase eines der 10 am stärksten synthetisierten Proteine während der Solventogenese. In dieser Wachstumsphase beträgt die Syntheserate das 32fache des Werts, der in der Acidogenese gemessen wird. Damit ist dieses Enzym das am stärksten induzierte Protein überhaupt (Schaffer, 1999; Schaffer et

al., 2002). Da auch die Transkription nahezu aller weiteren Gene, die an der Lösungsmittelbildung beteiligt sind, verstärkt bzw. ausschließlich im Zuge des Umschaltens auf die Lösungsmittelbildung (*shift*) erfolgt, liegt der regulatorische Schwerpunkt eindeutig auf transkriptioneller Ebene (Gerischer und Dürre, 1992; Walter et al., 1992; Sauer und Dürre, 1995). Einerseits könnte hierfür ein übergeordnetes Regulationsprinzip verantwortlich sein, andererseits läßt die sequentielle Reihenfolge, in der die Transkripte der entsprechenden Gene erscheinen (Sauer und Dürre, 1995), unterschiedliche individuelle Mechanismen der Regulation vermuten.

Als übergeordnetes Regulationsprinzip wäre für die Gene der Lösungsmittelbildung eine Regulation durch alternative Sigma- ( $\sigma$ -) Faktoren denkbar. Dagegen spricht jedoch, daß die jeweiligen Promoterstrukturen weitgehend die Konsensussequenz für eine  $\sigma^{70}$ - bzw.  $\sigma^{43}$ -abhängige RNA-Polymerase (Young et al., 1989; Sauer, 1992) besitzen, und daß die RNA-Polymerasen, die aus säure- bzw. lösungsmittelbildenden Zellen gereinigt wurden, keine Unterschiede aufweisen (Bahl, 1993). Die Regulation der Gene der Lösungsmittelbildung muß demnach über eine Modulation der Zugänglichkeit und/oder Effektivität der entsprechenden Promoterbereiche erfolgen, was für eine Regulation durch DNA-bindende Proteine spricht.

#### **4.3.1 Regulation durch DNA-bindende Proteine**

Für das *adc*-Operon erscheint eine Regulation über DNA-bindende Proteine am wahrscheinlichsten. Der globale Transkriptionsregulator Spo0A konnte in seiner aktiven phosphorylierten Form bereits als ein solches Protein identifiziert werden. In der nicht codierenden 5'-Region des *adc*-Operons liegen drei Spo0A-Bindestellen (0A-Boxen), die in je einer Base vom *Bacillus subtilis*-Konsensus (5'-TGNTGAA-3') (Burbulys et al., 1991) abweichen. Spo0A stellt einen globalen Transkriptionsfaktor dar, der in *Bacillus* und *Clostridium* (Brown et al., 1994) beschrieben wurde. Die DNA-bindende Aktivität des Proteins wird über die Phosphorylierung der N-terminalen Domäne reguliert. Spo0A ist an der Regulation einer Reihe unterschiedlicher Gene beteiligt und ist in der Lage, die Expression sowohl zu reprimieren, als auch zu aktivieren. Unabhängige Studien zeigen, daß Mutationen in den 0A-Boxen stromaufwärts des *adc*-Gens und sogar die vollständige Deletion der 0A-Boxen lediglich zu einer Reduktion der Transkription des *adc*-Gens unter Beibehaltung des Expressionsprofils führen (Ravagnani et al., 2000; Böhringer, 2002; Hollergschwandner, 2003). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß mindestens ein weiteres Protein an der Regulation des *adc*-Gens beteiligt sein muss. Einen ersten Hinweis auf die Bindung und den Bindungsort eines weiteren DNA-bindenden Regulatorproteins im *adc*-Promoterbereich

lieferten Reporterstudien von Böhringer (2002). Diese zeigen, daß eine Deletion von 32 Bp im Promoterbereich des *adc*-Gens (**Abb. 6**) unabhängig von den OA-Boxen zu einer drastischen Reduktion der Aktivität des Reportergens und damit des *adc*-Gens führt. Das verwendete Reporterensystem (Fischer, 1994) ist ein Fusionsprodukt aus dem Promoterbereich des *adc*-Gens aus *C. acetobutylicum* und dem *lacZ*-Gen aus *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 (Burchhardt und Bahl, 1991). Das System wurde bereits von Nakotte (1998) erfolgreich eingesetzt, so daß seine Funktionalität eindeutig gezeigt ist. Die enge Verwandtschaft der Gattung *Clostridium* und *Thermoanaerobacterium* begründet die ausreichende Expression des *lacZ*-Gens in *C. acetobutylicum*, und das Fehlen einer *C. acetobutylicum*-eigenen  $\beta$ -Galactosidase (Yu et al., 1987) sowie der aerobe Nachweis der verwendeten  $\beta$ -Galactosidase erlauben einen einfachen Enzymtest.

Der native Promoterbereich und der um 32 Bp verkürzte Promoterbereich wurden in einer DNA-Affinitätschromatographie zur Isolierung DNA-bindender Proteine eingesetzt und erlaubten die Isolierung und mit Hilfe einer anschließenden MALDI-TOF-Analyse die Identifizierung eines bis zu diesem Zeitpunkt nicht charakterisierten Proteins von *C. acetobutylicum*. Das in Datenbanken mit CAP (*Clostridium acetobutylicum* plasmid) 0037 annotierte Protein erhielt die Bezeichnung AdcR. Das zugehörige Gen *cap0037*, im weiteren *adcR*, bildet, wie RT-PCR-Analysen zeigten, ein Operon mit dem stromabwärts liegenden Gen *cap0036*, im weiteren *adcS*. Die beiden entsprechenden Proteine, AdcR und AdcS, stellen damit potentielle Transkriptionsregulatoren des *adc*-Gens dar. Die Beteiligung eines oder womöglich mehrerer Regulatorproteine, die zusammen mit Spo0A agieren, wurde in *B. subtilis* bisher nicht beschrieben. Es scheint daher eine Besonderheit des *adc*- und auch des *sol*-Operons (Feustel, 2004) und damit der Lösungsmittelbildung in *C. acetobutylicum* zu sein.

#### **4.3.2 Potentielle Bindestellen der Proteine AdcR und AdcS**

Die Isolierung des Proteins AdcR über seine Fähigkeit, an den Promoterbereich des *adc*-Gens zu binden, macht es zu einem potentiellen Transkriptionsregulator dieses Gens. AdcS, das auf Grund der Operonstruktur der zugehörigen Gene zusammen mit AdcR gebildet wird, könnte dabei ebenfalls von Bedeutung sein. Vorangegangene Studien von Böhringer (2002) und Nakotte (1998), die sich ebenfalls mit dem *adc*-Gen und dessen Regulation beschäftigen, sind eine gute Grundlage für eine Diskussion über potentielle Bindeorte des Proteins AdcR und auch des Proteins AdcS, auch wenn die Bindung letzteren Proteins in der anfänglichen DNA-Affinitätschromatographie nicht, wohl aber in den späteren Gel-retardationsexperimenten, gezeigt werden konnte.

#### 4.3.2.1 Bindung stromabwärts der -10-Region des *adc*-Gens

Reporterstudien von Böhringer (2002) zeigten, daß eine Deletion von 32 Bp stromabwärts der -10-Region des *adc*-Gens eine Reduktion der Transkription des Gens um ca. 80 % zur Folge hat. Böhringer (2002) stellte deshalb die These auf, daß ein potentieller transkriptionsaktivierender Regulator stromabwärts der -10-Region des *adc*-Gens binden könnte. Zwar gilt in der Regel, daß Proteine, die die Transkription aktivieren, in einem nahen Bereich stromaufwärts der -35-Region binden, während sich die Bindestelle reprimierender Faktoren oft stromabwärts der -10-Region befindet bzw. mit der -10- und -35-Region überlappt. Untersuchungen bei Eubakterien zeigen jedoch, daß auch die Bindung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren in dem Bereich zwischen der -10-Region und dem Transkriptionsstart und sogar bis hinein in die proteincodierende Sequenz nicht generell ausgeschlossen werden kann. Der Regulator Rns zur Transkriptionsaktivierung der *Pilin*-Gene in *E. coli* bindet beispielsweise an je eine Bindestelle stromaufwärts und stromabwärts seines eigenen Promoters (Mundson und Scott, 2000) und Mitglieder der AraC-Proteinfamilie, wozu Transkriptionsaktivatoren des Kohlenhydrat-Stoffwechsels, der Virulenz und der Streßantwort gehören (Gallegos et al., 1997), binden in *E. coli* in einer Region stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts und der Sequenz der Gene, deren Expression sie regulieren (Mundson et al., 2001). Auch in dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* läßt sich ein entsprechendes Beispiel finden. Der *response regulator* PhoP, der die Antwort auf Phosphatmangel aktiviert, bindet in einer Region in der proteincodierenden Sequenz der Gene *phoA* und *pstS* (Liu et al., 1998). Die Tatsache aber, daß das Protein AdcR sowohl unter Verwendung der nativen, als auch der deletierten Sequenz in der DNA-Affinitätschromatographie isoliert werden konnte, widerlegt die von Böhringer (2002) aufgestellte These jedoch eindeutig. Auch in den Gelretardationsexperimenten war eine Bindung des Proteins AdcR an das native und das deletierte *adc*-Promoterfragment nachgewiesen worden. Eine Erklärung dafür, daß Böhringer (2002) dennoch eine Reduktion der Expression des Reportergens und damit des *adc*-Gens bei beschriebener Verkürzung des Promoterbereichs messen konnte, könnte sein, daß die Deletion im Abstand von nur 2 Bp vom Transkriptionsstart begann. Die gemessene Aktivität des Deletionskonstrukts könnte auf Grund dessen auch auf einen Artefakt zurückzuführen sein.

#### 4.3.2.2 Heptamermotiv und Palindrom:

##### Potentielle Bindestellen im *adc*-Promoterbereich?

Da der von Böhringer (2002) postulierte Bereich stromabwärts der -10-Region als Bindeort für das AdcR-Protein ausgeschlossen werden kann, galt es, nach

weiteren potentiellen Bindestellen zu suchen. Bei näherer Betrachtung der in der DNA-Affinitätschromatographie eingesetzten Promoterfragmente fallen zwei bereits von Fischer (1993) für das *sol*-Operon identifizierte Sequenzbereiche stromaufwärts der -10-Region auf, die von Nakotte (1998) als mögliche regulatorisch interessante Bereiche untersucht wurden und ihn vermuten ließen, daß die Regulation des *adc*-Gens über DNA-bindende Proteine erfolgt. Bei den genannten Motiven handelt es sich um ein Heptamermotiv und eine palindromische Sequenz, wobei ein Teil des Heptamermotivs mit einem Teil der palindromischen Sequenz überlappt (**Abb. 44**). Die Annahme, daß vor allem das Heptamermotiv eine mögliche regulatorisch aktive Sequenz darstellt, wird von der Erkenntnis bestärkt, daß es trotz seines hohen GC-Gehalts nur im Bereich des *adc*-Operons und des *sol*-Operons von *C. acetobutylicum* zu finden ist. Da die Interaktion von DNA-bindenden Proteinen mit ihren Zielsequenzen insbesondere auf der Seltenheit bzw. Einzigartigkeit dieser Sequenzmotive beruht, ist vermutet worden, daß längere Sequenzabschnitte für die Bindung von Regulatorproteinen notwendig sind oder entsprechende Regionen einen höheren GC-Gehalt besitzen (Young und Cole, 1993). Für den *thl*-Operator aus *C. acetobutylicum* konnte jedoch gezeigt werden, daß auch eine ausschließlich AT-haltige Operatorsequenz von 27 Bp Länge eine hochspezifische DNA-Protein-Interaktion ermöglicht (Schaffer, 1999). Das postulierte Prinzip von Young und Cole (1993) kann daher nicht als allgemeingültig angesehen werden. Auch zunächst unauffällig erscheinende Sequenzen können Bindestellen für Regulatorproteine darstellen. Expressionsstudien von Transformanten mit Substitutionen im Bereich des *adc*-Promoters (Nakotte, 1998) unter Verwendung des beschriebenen Reportersystems zeigen, daß das Heptamermotiv und die palindromische Sequenz in bezug auf die Regulation des *adc*-Gens gegenläufige Einflüsse besitzen. Die Veränderung des Heptamermotivs hat einen negativen, die des Palindroms einen positiven Effekt auf die Transkription des *adc*-Gens. Für die Beteiligung DNA-bindender Proteine würde dies bedeuten, daß das Heptamermotiv eine DNA-Bindestelle für einen Aktivator und die des Palindroms eine DNA-Bindestelle für einen Repressor darstellen könnte. Im Fall des Palindroms könnte von einem Protein, das als Dimer an die DNA bindet, ausgegangen werden, da die palindromische Sequenz genau 20 Bp auseinander liegt, was zwei DNA-Windungen einer *in vivo* vorliegenden B-Helix entspricht.

Ähnliche Experimente zur Untersuchung des Promoterbereichs des *adc*-Gens von Böhringer (2002) lieferten Ergebnisse, die mit den Ergebnissen von Nakotte (1998) nur zum Teil übereinstimmen. Da die Ergebnisse von Böhringer (2002) jedoch auf Konstrukten beruhen, die nicht von einem gemeinsamen Ursprungskonstrukt abstammen und die Aktivitäten der zugehörigen Stämme

ATATAAATCT	ATTATGCAGA	ATTTTTAGGA	AGTGTACTTT	-171
TATTTTCGAA	AGCTAGTAGA	AAAATAAAT	>>>> >> ATATGGTGTA	-131
<b>-35-Region</b> AAA <u>ATTTACT</u>	<< TAAAAAACA	<<<< ATATGTGTTA	<b>-10-Region</b> TAATGTAAT	-91
<b>adc-mRNA</b> ATAAATAAAT └───▶	AGGACTAGAG	GCGATTTATA	ATGTGAAGAT	-51
AAAGTATGTT	AGAAAAGCTA	AACATTATTA	AATTTAGGAA	-11
GGTGACTTTT	<b>Startcodon</b> ATGTTAAAGG	ATGAAGTAAT		+20

**Abb. 43 Promoterbereich des *adc*-Gens**

>>>>: Palindrom, ACAATAT: Heptamermotiv, ATG: Startcodon, unterstrichen: -10/-35-Region, └───▶ mRNA-Start, grau: 32-Bp-Deletion. Die Zahlen geben die Entfernung zum (-) bzw. vom (+) Translationsstartpunkt an.

zusätzlich nicht unter vergleichbaren Bedingungen untersucht wurden, bleiben sie unberücksichtigt.

Die beiden Proteine AdcR und AdcS könnten derartige DNA-bindende Regulatorproteine mit gegenläufigem Einfluß auf die Transkription des *adc*-Gens darstellen. Ihre Fähigkeit zur DNA-Bindung wurde eindeutig in Gelretardationsexperimenten gezeigt. Ein gegenläufiger Einfluß der Proteine kann angenommen werden, da die Überproduktion des Proteins AdcR zu einer erniedrigten und die des Proteins AdcS zu einer erhöhten Acetonbildung im Vergleich zum Wildtyp führt, wie Studien der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme zeigten. Das Protein AdcS stellt somit einen potentiellen Transkriptionsaktivator und das Protein AdcR einen potentiellen Transkriptionsrepressor dar. Da beide Proteine, auf Grund der Operonstruktur der zugehörigen Gene, gleichzeitig vorliegen und die postulierten Bindestellen überlappen, muß davon ausgegangen werden, daß eine Konkurrenzsituation der beiden Regulatorproteine um eine DNA-Bindung vorhanden ist. Da die Konzentration der vorhandenen Regulatoren nicht verantwortlich für die Bindung des einen oder anderen Regulators sein kann, muß deren Affinität zur Bindestelle die Richtung der Regulation bestimmen. Ob das Protein AdcR tatsächlich an das Palindrom und das Protein AdcS tatsächlich an das Heptamermotiv bindet, kann bis jetzt nur vermutet werden. *Footprinting*-Experimente sind notwendig, um den Bindungsort der Proteine AdcR und AdcS eindeutig zu bestimmen.

Mit diesen Erkenntnissen wäre die von Fischer (1993) aufgestellte Hypothese, daß es sich bei dem Heptamermotiv um eine Bindestelle eines potentiellen Repressorproteins handeln könnte, widerlegt, da dies offensichtlich weder für das *adc*-Operon, noch für das *sol*-Operon zutrifft. Die Analysen von Thormann (2001) für das *sol*-Operon sprechen ebenfalls eindeutig gegen die Funktion des Motivs als Repressorbindestelle, stehen jedoch auch nicht im Einklang mit dem für das *adc*-Gen beobachteten positiven Einfluß auf die Regulation. Basensubstitutionen im Bereich des Heptamermotivs des *sol*-Promoters ergaben lediglich eine gleichbleibende, in keinem Fall aber eine erhöhte Genexpression. Demzufolge ist zu vermuten, daß trotz des Vorhandenseins eines im *adc*- und *sol*-Promoterbereich identischen Motivs kein den beiden Operonen gemeinsamer Regulationsmechanismus zugrunde liegt. Es ist jedoch hier unbedingt zu erwähnen, daß die Versuche für den *sol*- und den *adc*-Promoter mit zwei verschiedenen Reportergensystemen durchgeführt wurden, so daß ein direkter Vergleich der Experimente nur eingeschränkt möglich ist. Beim Vergleich der Lage der diskutierten Motive im Promoterbereich des *adc*- und *sol*-Operons fällt außerdem ein gravierender Unterschied ins Auge: Im *adc*-Promoterbereich liegen die beiden Motive in direkter Nähe zur -10- und -35-Region. Im *sol*-Promoterbereich dagegen sind beide Motive erst deutlich weiter stromabwärts zu finden. Sie liegen in dem Bereich, in dem früher ein weiterer Transkriptionsstart des *sol*-Operons vermutet wurde. Eine derartige Funktion dieses Bereichs als Promoter wurde jedoch widerlegt (Thormann, 2001). Die Haupttranskriptmenge des *sol*-Operons wird von dem weiter stromaufwärts gelegenen Promoter gebildet. Thormann (2001) kam zu der Überzeugung, daß die weiter stromabwärts liegende Transkriptionsstelle durch RNA-Prozessierung resultierte. Auf Grund der neuen Erkenntnisse bezüglich der Proteine AdcR und AdcS sollte dennoch unter Anwendung von Gelretardationsexperimente überprüft werden, ob diese nicht möglicherweise an die diskutierte Region im Bereich des *sol*-Promoters binden.

#### **4.3.3 Spezifität der Bindung der Proteine AdcR und AdcS**

Zwar konnte für die Proteine AdcR und AdcS die konzentrationsabhängige Bindung an DNA nachgewiesen werden, der eindeutige Beweis der Spezifität der Bindung steht jedoch noch aus. Auch Schaffer (1999) konnte bereits in Gelretardationsexperimenten zeigen, daß beim Einsatz von fraktionierten Rohextrakten für den intergenen Bereich stromaufwärts des *adc*-Gens die Bindung eines Proteins in definierter Stöchiometrie zu beobachten ist, jedoch war es auch hier nicht möglich, die Spezifität der Bindung zu belegen. Die strenge Stöchiometrie der DNA-Protein-Komplexe im Fall von Schaffer (1999) und im Fall der Proteine AdcR und AdcS spricht jedoch nahezu zweifelsfrei gegen eine sequenz-

unabhängige Bindung, wie sie z. B. für eine Nuklease oder ein histonähnliches Protein zu beobachten ist. Eher denkbar ist eine um 2-3 Größenordnungen geringere Affinität zu unspezifischer DNA, wie sie auch schon für andere regulatorisch aktive Proteine nachgewiesen wurde (Ausubel et al., 1987). Dies hat zur Folge, daß in Gelretardationsexperimenten mit derart niedrigen Proteinkonzentrationen gearbeitet werden muß, daß es schwer wird, nicht an die Nachweisgrenze der gewählten Methode zu stoßen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß die DNA-bindende Aktivität *in vivo* durch weitere zelluläre Komponenten moduliert wird. Sowohl beim Einsatz von fraktionierten Rohextrakten als auch beim Einsatz von gereinigtem Protein in Gelretardationsexperimenten könnten genau jene für die Bindung essentiellen zellulären Komponenten im Laufe der Reinigung abgetrennt worden sein. Dabei könnte es sich um Proteine mit Modulationsfunktion, wie z. B. Tyrosinkinasen, handeln, die selbst nicht an DNA binden, oder auch um niedermolekulare Effektoren, die durch ihre Bindung an Regulatorproteine deren Konformation und damit ihre DNA-bindenden Eigenschaften verändern. Auch eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Proteine AdcR und AdcS kann nicht ausgeschlossen werden. Einige Ergebnisse der Gelretardationsexperimente lassen dies vermuten und zwar derart, daß das Protein AdcS die Bindung von AdcR an die DNA schwächt. Ob eine gegenseitige Beeinflussung auf einer Interaktion der Proteine beruht, kann nur spekuliert werden. Einen ersten Hinweis darauf lieferte ein Versuch (Experiment und Ergebnisse nicht gezeigt), in welchem gereinigtes AdcR x 6His an Ni-NTA gekoppelt und mit Rohextrakt aus *C. acetobutylicum* (Wildtyp) inkubiert wurde. Proteine, die mit AdcR x 6His interagierten, wurden anschließend eluiert. Unter diesen Proteinen befanden sich auch Proteine, die eine Größe des Proteins AdcS aufwiesen. Ebenfalls in Betracht zu ziehen wäre, daß für eine spezifische Bindung von AdcR und/oder AdcS das globale Regulatorprotein Spo0A notwendig ist. Erste in diese Richtung durchgeführte Gelretardationsexperimente (Ergebnisse nicht gezeigt) lassen darüber jedoch keine Aussagen zu, so daß derartige Experimente unbedingt wiederholt und weiterverfolgt werden müssen. Letztendlich darf nicht vergessen werden, daß die Proteine AdcR und AdcS nur unter bedingt nativen Bedingungen in den Gelretardationsexperimenten eingesetzt wurden, da durch das Anhängen des *his-tags* die Faltung und damit die Aktivität der Proteine stark beeinträchtigt sein kann. Sie könnten sich auf Grund dessen anders verhalten, als sie es unter nativen Bedingungen tun würden. Um das zu überprüfen, wäre es notwendig, die Proteine zwar für die Reinigung mit einem *tag* zu versehen, diesen aber nach der Reinigung wieder abzuspalten. Auf diese Weise könnten unter der Voraussetzung, daß sich die Proteine anschließend richtig falten, zumindest in bezug auf die Proteinfaltung *in vivo*-Bedingungen hergestellt werden.

#### **4.3.4 Funktionsanalyse des Proteins AdcR**

Verschiedene computergestützte Analysen des Proteins AdcR ergaben, daß das Protein zwei auffällige Domänen besitzt. Im N-terminalen Bereich läßt sich eine DNA-bindende Domäne in Form eines *helix-turn-helix*-Motivs, weiter C-terminal eine potentielle transmembrane Domäne identifizieren. Diese Domänen lassen auf die Zugehörigkeit des Proteins zu bestimmten Proteinfamilien schließen und einhergehend damit Spekulationen über eine mögliche Funktion zu.

##### **4.3.4.1 AdcR, ein Mitglied der MerR-Proteinfamilie**

Über das *helix-turn-helix*-Motiv (HTH\_MERR Motiv, *helix-turn-helix*, *mercury resistance*) läßt sich das AdcR-Protein der Familie der MerR-Proteine zuordnen. Bei den Mitgliedern der MerR-Familie handelt es sich um dimere Transkriptionsregulatoren, die die Transkription bestimmter Gene aktivieren, wenn die Bakterienzelle Streß ausgesetzt wird. Streßsignale können Sauerstoffradikale, Schwermetalle und cytotoxische Komponenten sein (Brown et al., 2003). Der Angriffspunkt dieser Transkriptionsaktivatoren sind  $\sigma^{70}$ - (Gram-negative Bakterien) bzw.  $\sigma^A$ / $\sigma^{54}$ -abhängige (Gram-positive Bakterien) Promotoren mit einer *Spacer*-Länge von 19 Bp (Summers, 1992; Ansari et al., 1995; Outten et al., 1999). Als *Spacer* wird der Bereich zwischen den -35- und -10-Hexameren des Promoters bezeichnet. Im Falle der Erkennung des eubakteriellen Promoters durch primäre Sigmafaktoren ( $\sigma^{70}$  bzw.  $\sigma^A/\sigma^{54}$ ) beträgt die *Spacer*-Länge typischerweise 17 Bp (Harley und Reynolds, 1987). Abweichungen von dieser Konsensuslänge haben eine Verminderung der promoterabhängigen Transkription *in vitro* und *in vivo* zur Folge (Russel und Bennett, 1982; Stefano und Gralla, 1982; Mulligan et al., 1985). Wang und Syvanen (1992) vermuten darüber hinaus, daß die Transkription zusätzlich durch die Orientierung der -35- und -10-Region des Promoters zueinander reguliert wird. Die optimale Orientierung ist dabei bei einer *Spacer*-Länge von 17 Bp gegeben. Bei einer verminderten oder vergrößerten *Spacer*-Länge kann durch eine veränderte helikale Windungszahl ebenfalls eine optimale Orientierung der -35- und -10-Region erzielt werden, so daß die Transkription in diesem Fall vom Grad der Superspiralisierung abhängig ist. Promotoren können demnach über die superhelikale Dichte der DNA reguliert werden. Diese ändert sich zum Beispiel in Abhängigkeit von Umgebungsbedingungen und/oder der Wachstumsphase des Bakteriums. Für *C. acetobutylicum* konnte gezeigt werden, daß die helikale Windungszahl und damit der Grad der Superspiralisierung der DNA beim Übergang von der Acidogenese in die frühe Phase der Solventogenese abnimmt (Wong und Bennett, 1996). Diese Beobachtung deckt sich mit dem positiven Einfluß, den die Hemmung der Gyrase, verursacht durch eine Novobiocin-Zugabe,

auf die Transkription des *adc*-Gens ausübt (Ullmann et al., 1996). Die *Spacer*-Länge des *adc*-Promoters beträgt 18 Bp und weicht damit von der optimalen *Spacer*-Länge ab. Eine Verminderung der *Spacer*-Länge um 1 Bp auf die optimale Länge führt zu einer um 20 % gesteigerten Transkription des *adc*-Gens (Böhringer, 2002), womit der Einfluß der Superspiralisierung erneut deutlich wird. Da Proteine der MerR-Familie charakteristisch an Promotoren mit verlängerter *Spacer*-Region binden, könnte AdcR ein solches Protein darstellen. Für den Regulator des *multidrug transporters* Bmr, BmrR, ein gut untersuchtes Mitglied der MerR-Proteinfamilie, konnte gezeigt werden, daß dieser über seine Bindung an die DNA die -35 und -10-Region in die notwendige optimale Orientierung zueinander bringt und auf diese Weise die Transkription aktiviert (Newberry und Brennan, 2004). Bei Betrachtung der Ergebnisse der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme erscheint die Funktion des AdcR-Proteins als Aktivator zunächst unwahrscheinlich. Eine Überproduktion des AdcR-Proteins führt zu einer verminderten Acetonbildung, was vielmehr für eine Funktion von AdcR als Repressor spricht. Bei genauer Betrachtung des MerR-Proteins, das der Familie der MerR-Proteine den Namen gab und seines Regulationsmechanismus' (O'Halloran et al., 1989), wird deutlich, wie dasselbe Protein sowohl als Aktivator, als auch als Repressor tätig sein kann. MerR bindet unabhängig von der Anwesenheit seines Induktors an den *mer*-Promoter und agiert in diesem Fall als Repressor der Transkription der stromabwärts liegenden Gene. Erst bei Vorhandensein des Induktors Quecksilber erfolgt die Induktion der Transkription der *mer*-Gene. Quecksilber bindet an das MerR-Protein, woraufhin sich die Bindeeigenschaft des Proteins an die DNA ändert und zwar derart, daß das Protein in Anwesenheit von Quecksilber sozusagen 'weniger stark' an die DNA bindet. Eine so hervorgerufene Destabilisierung des DNA-MerR-Komplexes führt zu einer Entspannung der DNA (Ansari et al., 1995) und auf diese Weise dazu, daß die -35- und -10-Region in die optimale Lage zueinander gebracht werden. Die RNA-Polymerase kann binden und die Transkription wird aktiviert. Überträgt man den geschilderten Mechanismus auf das AdcR-Protein, so würde dies bedeuten, daß AdcR ständig an den Promoterbereich des *adc*-Gens bindet und damit die Transkription des Gens reprimiert. Da die Gene *adcR* und *adcS* ein Operon bilden, liegen die Proteine AdcR und AdcS gleichzeitig vor. Es ließe sich folglich vermuten, daß das Protein AdcS, das, wie die Studien der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme zeigen, eine aktivierende Funktion hat, die durch das AdcR-Protein hervorgerufene Repression der Transkription aufzuheben vermag. Eine unterschiedliche Effektivität der beiden Proteine würde erklären, wieso keine ständige Derepression des *adc*-Gens auftritt. AdcR bindet schon in sehr geringer Konzentration an die DNA des *adc*-Promoters und reprimiert die Transkription des Gens. AdcS dagegen muß in deutlich höherer Konzentration vorliegen, um die

dereprimierende Eigenschaft geltend zu machen. Diese Thesen passen zu den Ergebnissen der Gelretardationsexperimente. Hier zeigte sich, daß schon geringe AdcR-Konzentrationen ausreichen, um eine Bindung an die entsprechenden *adc*-Promoterfragmente nachzuweisen. Außerdem führte eine gleichzeitige Inkubation der entsprechenden DNA-Fragmente mit beiden Proteinen dazu, daß die Bindung von AdcR an die DNA geschwächt wurde. Wie AdcS seine dereprimierende und damit aktivierende Funktion ausübt, kann auf Grund der nicht eindeutigen Ergebnisse der Gelretardationsexperimente bisher nur vermutet werden. Denkbar wäre eine Protein-Protein-Interaktion, die bewirkt, daß die Bindung von AdcR an die DNA geschwächt und wie beim *mer*-Promoter die Transkription aktiviert wird. Ebenfalls möglich wäre, daß AdcS selbst an die DNA bindet und dadurch die Transkription aktiviert. Sicher scheint, daß die Bindung von AdcR an die DNA durch die Interaktion mit AdcS oder aber durch die Bindung von AdcS selbst an die DNA nicht aufgehoben wird, denn den Gelretardationsexperimenten ist zu entnehmen, daß der durch die Bindung von AdcR gebildete DNA-Protein-Komplex auch beim zusätzlichen Einsatz des Proteins AdcS noch nachzuweisen ist. Weiterführende Experimente müssen das genaue Bindeverhalten von AdcS an die DNA klären. Erst dann sind weitere Aussagen möglich.

Für die angeführten mechanistischen Vorstellungen des Zusammenspiels der Proteine AdcR und AdcS spricht auch der für die Regulation des *tipA*-Promoters aus *Streptomyces lividans* gezeigte Regulationsmechanismus. Der *tipA*-Promoter kontrolliert die Transkription der Gene *tipAL* und *tipAS*, die ein Operon bilden, und die Regulation erfolgt durch die entsprechenden Proteine TipAL und TipAS (Murakami et al., 1989; Holmes et al., 1993), weswegen der Promoter für die kontrollierte Expressionen klonierter Gene in *Streptomyces* eingesetzt wird (Takano et al., 1995; Yu und Hopwood et al., 1995; Enguita et al., 1996). Das Regulatorprotein TipAL bindet unabhängig von weiteren Faktoren an den *tipA*-Promoterbereich und aktiviert die Transkription. Bei Anwesenheit von Thiostrepton im Medium wird die Affinität der Bindung an die entsprechende DNA jedoch deutlich erhöht (Holmes et al., 1993). Das das TipAL-Protein codierende Gen *tipAL* bildet ein Operon mit dem stromabwärts gelegenen Gen *tipAS*, so daß beide Proteine gleichzeitig gebildet werden. Eine derartige Organisation entspricht der Anordnung der Gene *adcR* und *adcS*. Das Protein TipAS hat die Funktion Thiostrepton abzufangen und damit die Bindung von TipAL an den Promoter und die Transkription zu regulieren. Möglich ist dies durch eine Regulation der Bildung von TipAS. Inwiefern im Fall der Proteine AdcR und AdcS ein zusätzlicher Induktor eine Rolle spielt, kann bisher nicht gesagt werden.

#### 4.3.4.2 AdcR, ein ToxR-ähnliches Protein?

Eine transmembrane Domäne und damit die Membranständigkeit ist zwar sehr untypisch für einen DNA-bindenden Transkriptionsregulator, schließt eine solche Funktion jedoch nicht aus. Mit dem Protein ToxR aus *Vibrio cholerae* wurde bereits ein membranständiges DNA-bindendes Protein beschrieben (Miller et al., 1987). Mittlerweile wurden weitere membranständige Regulatoren sowohl in *Vibrio cholerae* (Tcp, Häse und Mekalanos, 1998 und CadA, Merrell und Camilli, 2000) und anderen *Vibrio*-Spezies (Lin et al., 1993; Reich und Schoolnik, 1994), als auch in verschiedenen Gram-negativen Organismen wie *E. coli* (Neely et al., 1994), *Salmonella typhimurium* (Blanc-Potard et al., 1999), *Yersinia ssp.* (Yang und Isberg, 1997) und *Photobacterium* (Welch und Barlett, 1998) beschrieben. Allen diesen Proteinen ist gemeinsam, daß sie sich aus einem cytoplasmatischen N-Terminus und einem periplasmatischen C-Terminus zusammensetzen, getrennt durch einen kurzen transmembranen Bereich. Oft agieren diese Proteine in Zusammenarbeit mit weiteren cytoplasmatischen Effektorproteinen, die ihre Aktivität verstärken. Die zugehörigen Gene bilden ein Operon. Im Fall von ToxR erfolgt die DNA-Bindung über ein *helix-turn-helix*-Motiv, genauer über ein sog. *winged helix-turn-helix*-(W-HTH) Motiv, das das Protein ToxR der Familie der OmpR/PhoB-Familie der Transkriptionsregulatoren zuordnet. Das ToxR-Protein bildet seiner Struktur und Funktion nach ein sog. Ein-Komponenten-System. Proteine, die ein Ein-Komponenten-System darstellen, sind regulatorisch aktive Proteine, bestehend aus einer Signal-*input*-Domäne und einer DNA-bindenden *output*-Domäne (Ulrich et al., 2005). Sie vereinen damit die Funktionen und Domänen-Struktur zweier Proteine eines sog. Zwei-Komponenten-Systems in einem einzigen Protein. Unter den Proteinen, die zu den Ein-Komponenten-Systemen gerechnet werden, stellt das ToxR-Protein insofern eine Besonderheit dar, als es kein rein cytoplasmatisches Protein ist, wie 97 % (Ulrich et al., 2005) der anderen Proteine, die ein solches System repräsentieren.

Cholera ist eine schwere Durchfallerkrankung, hervorgerufen durch das Bakterium *Vibrio cholerae*. ToxR reguliert *in trans* die Transkription des *ctx*-Operons, das die beiden Untereinheiten des Cholera-Toxins codiert, aus denen das multimerere aktive Toxin zusammengesetzt ist (Mekalanos et al., 1983). Das ToxR-Protein spielt weiterhin auch eine Rolle bei der Produktion eines Pilus, der für die Kolonisation von *Vibrio cholerae* notwendig ist (TcpA, Taylor et al., 1987) und der Expression eines *outer-membrane proteins* OmpU (Miller, 1985). ToxR scheint damit für die koordinierte transkriptionelle Regulation verschiedener Virulenzfaktoren in *Vibrio cholerae* eine Rolle zu spielen (Betley et al., 1986). Die Umweltsignale, welche die Expression des Toxins hervorrufen, sind unbekannt. Künstliche Expression kann u. a. durch die Zusammensetzung des Mediums, die Osmolarität, den pH, die Inkubationstemperatur und die Sauerstoffkonzentration

verursacht werden (Mekalanos, 1985). Die Lokalisation des ToxR-Proteins in der Membran könnte erklären, wie dasselbe Protein in der Lage ist, verschiedene physiologische und nahrungsbedingte Parameter wahrzunehmen. Hier könnte eine Analogie zu den bakteriellen Chemorezeptoren Tar und Tsr hergestellt werden, die ebenfalls auf die unterschiedlichsten Signale ansprechen. ToxR reguliert direkt die Transkription des *toxT*-Gens, während das entsprechende Genprodukt ToxT wiederum direkt an der Regulation des *ctx*-Operons beteiligt ist. Zusätzlich ist für die Regulation des *toxT*-Gens das Protein TcpP notwendig, das wie ToxR ein membranständiges Regulatorprotein darstellt (Häse und Mekalanos, 1998; Yu und DiRita, 1999). Mechanistisch kann für die Regulation des *toxT*-Gens folgendes Modell (Krukoniš et al., 2000) aufgestellt werden: Die Proteine ToxR und TcpP sind für die Aktivierung der Transkription des *toxT*-Gens notwendig. Beide Proteine binden an unterschiedlichen Regionen des *toxT*-Promoters. TcpP stellt dabei den eigentlichen Aktivator des *toxT*-Gens dar, während ToxR eine unterstützende Funktion zukommt. Die Bindung des membranständigen ToxR-Proteins an den *toxT*-Promoter sorgt dafür, daß der *toxT*-Promoterbereich in die Nähe der Membran und damit in die Nähe des schlechter bindenden Proteins TcpP gelangt, so daß dieses ebenfalls an den Promoterbereich binden kann. TcpP ist dadurch in der Lage, mit der RNA-Polymerase zu interagieren und so die Transkription zu aktivieren. Auch wenn bis jetzt nicht klar ist, wie die RNA-Polymerase in die Nähe der Membran gelangt, ist eine derartige Transkriptionsaktivierung bereits von anderen Autoren beschrieben worden (Rowen und Deretic, 2000).

Die unter Anwendung des Computers vorausgesagten Domänen des AdcR-Proteins, ein N-terminales *helix-turn-helix*-Motiv und eine weiter C-terminal gelegene transmembrane Domäne, lassen das Protein strukturell dem ToxR-Protein gleichen. Das die Lösungsmittelbildung auslösende Signal ist ebenfalls noch weitgehend unbekannt. Es scheint sich nicht um nur ein einziges Signal, sondern vielmehr um eine Kombination aus verschiedenen intra- und extrazellulären Faktoren zu handeln (Dürre et al., 1995; Ullmann et al., 1996). Die Lokalisation eines signalaufnehmenden Proteins in der Membran wäre demnach auch hier sinnvoll. Derartige Proteine können direkt Veränderungen der osmotischen Bedingungen und der Ionenverhältnisse sowie Veränderungen im elektrochemischen Potential wahrnehmen. Die Strukturähnlichkeit der Proteine ToxR und AdcR und der komplexe Regulationsmechanismus des *toxT*-Gens könnte darauf hindeuten, daß auch die Regulation des *adc*-Gens ein derart komplexes Netzwerk darstellt. Die Anzeichen, daß sowohl der globale Regulator Spo0A, als auch die potentiellen Transkriptionsregulatoren AdcR und AdcS hierbei eine Rolle spielen, untermauern diese These. Weitere Versuche, die die Bindungseigenschaften der einzelnen Proteine und deren Interaktionen bestimmen, könnten

klären, ob und inwiefern eine Regulation ähnlich der des *toxT*-Promoters anzunehmen ist.

#### 4.3.4.3 ECF-Sigmafaktoren

Zunächst lag die Vermutung nahe, daß das Protein AdcR als potentieller Transkriptionsregulator des *adc*-Gens der Familie alternativer Sigmafaktoren, sog. ECF-Sigmafaktoren (ECF: *extracytoplasmatic function*) (Lonetto et al., 1994) zugehörig ist. Die ECF-Sigmafaktoren bilden eine Untergruppe der  $\sigma^{70}$ -Klasse der Sigmafaktoren. Der erste identifizierte ECF-Sigmafaktor war  $\sigma^E$  aus *E. coli*, der daran beteiligt ist, die Akkumulation falsch gefalteter Proteine im Periplasma zu verhindern. Weitere ECF-Sigmafaktoren sind u. a. an der Kontrolle der Expression von Genen beteiligt, deren Genprodukte extrazelluläre Enzyme (*Pseudomonas aeruginosa*, AlgU; Hershberger et al., 1995; Yu et al., 1995; Martinez-Salazar et al., 1996) und hochaffine Aufnahmesysteme (*E. coli*, Fecl; Enz et al., 1995) darstellen oder in die Synthese von Antennenpigmenten (*Myxococcus xanthus*, CarQ; Gorham et al., 1996) involviert sind. Sie ermöglichen auf diese Weise die Reaktion der Bakterienzelle auf einen äußeren Stimulus. Extrazelluläre Signale sind u. a. auch Auslöser für das Umschalten des Stoffwechsels von Säure- auf Lösungsmittelproduktion und passen somit gut in den Funktionskreis bekannter ECF-Sigmafaktoren. Mehrere Faktoren sprechen jedoch gegen die Funktion von AdcR und auch von AdcS als Sigmafaktor. Zum einen konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, daß die Promoterstrukturen der an der Lösungsmittelbildung beteiligten Gene weitgehend die Konsensussequenz einer  $\sigma^{70}$ - bzw.  $\sigma^{43}$ -abhängigen RNA-Polymerase (Young et al., 1989; Sauer, 1992) aufweisen, und zum anderen, daß die RNA-Polymerasen, die aus säure- bzw. lösungsmittelbildenden Zellen gereinigt wurden, keine Unterschiede zeigen (Bahl, 1993). Hinzu kommt, daß die in dieser Arbeit durchgeführten Gelretardationsexperimente keine Änderung des Bindeverhaltens von AdcR bzw. AdcS an die Promoterfragmente des *adc*-Gens zeigten, wenn das entsprechende Protein zusammen mit dem RNA-Polymerase-Holoenzym inkubiert wurde. Zudem ergaben Datenbankanalysen keine Ähnlichkeit der Proteine AdcR und AdcS zu bekannten ECF-Sigmafaktoren. Eine Funktion der Proteine als Sigmafaktoren kann demnach ausgeschlossen werden. Von Bedeutung könnte jedoch die Tatsache sein, daß ECF-Sigmafaktoren z. T. durch Anti-Sigmafaktoren reguliert werden. Für die Anti-Sigmafaktoren RseA (*E. coli*, Sigmafaktor  $\sigma^E$ ; De Las Penas, et al., 1997; Missiakas et al., 1997) und MucA (*P. aeruginosa*, Sigmafaktor AlgU; Schurr et al., 1996; Xie et al., 1996) konnte gezeigt werden, daß sie in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, und zwar der Art, daß der C-Terminus des Proteins ins Periplasma und der N-Terminus des Proteins ins Cytoplasma ragt.

Außerdem scheinen beide Anti-Sigmafaktoren direkt mit ihren jeweiligen Sigmafaktoren zu interagieren. In einem Modell (Missiakas und Raina, 1998) kann demnach folgendes regulatorisches Zusammenspiel zwischen dem ECF-Sigmafaktor und seinem entsprechenden Anti-Sigmafaktor angenommen werden: Der in der Membran verankerte Anti-Sigmafaktor könnte für die Signalerkennung und -weiterleitung verantwortlich sein, vergleichbar mit der Funktion einer Histidin-Kinase in einem Zwei-Komponenten-System. Die Bindung des Sigmafaktors durch den Anti-Sigmafaktor inhibiert die Aktivität des Sigmafaktors, wobei bis jetzt noch unklar ist, wie die Freisetzung des Sigmafaktors erfolgt. Es wird spekuliert, daß eine Konformationsänderung, eine chemische Modifikation oder eine Degradation des Anti-Sigmafaktors dafür verantwortlich ist. Die Freisetzung des Sigmafaktors führt dann zur Aktivierung der Transkription weiterer Gene. AdcR ähnelt von seiner Struktur einem ECF-Anti-Sigmafaktor und es ist nicht auszuschließen, daß AdcR einen ebensolchen darstellt. Die dargelegte reprimierende Aktivität des Proteins paßt zu dieser These. Da aber AdcS den Ergebnissen zu Folge keinen Sigmafaktor darstellt, handelt es sich hier wohl nicht um einen typischen ECF-Sigmafaktor/Anti-Sigmafaktor-Mechanismus, sondern vielmehr um einen Aktivator/Repressor-Mechanismus, der oben genanntem Mechanismus ähnelt. AdcR könnte als membranständiger Repressor das AdcS-Protein, das einen Aktivator darstellt, binden und erst unter bestimmten Bedingungen, wahrscheinlich wahrgenommen über die transmembrane Domäne des Proteins, in das Cytoplasma entlassen. In geschildertem Fall würde AdcR nicht an die DNA binden, was nicht mit den Ergebnissen der Gelretardationsexperimente im Einklang steht. Weitere Versuche sind deshalb notwendig, um das Zusammenspiel der Proteine AdcR und AdcS zu untersuchen.

#### **4.3.5 AdcR-/AdcS-Homologe in *Bacillus subtilis***

*B. subtilis* gehört wie *C. acetobutylicum* der Gram-positiven, sporenbildenden *Bacillus/Clostridium*-Gruppe an. Die Erstbeschreibung von *B. subtilis* erfolgte 1835 durch Ehrenberg als *Vibrio subtilis*. Durch Cohn erfolgte 1872 die Umbenennung in *B. subtilis* und durch Fisher 1995 die Zuordnung zur gleichnamigen Gattung (Priest, 1993). Das Vorkommen AdcR- und AdcS-homologer Proteine in *B. subtilis* (YhbD, YhbE und YhbF), das weder ein *adc*-Gen enthält, noch zur Produktion von Aceton fähig ist, erscheint zunächst unverständlich. Da in *C. acetobutylicum* aber ein Zusammenhang zwischen der Acetonbildung, der Initiation der Sporulation (Jones et al., 1982) und der Auslösung der Hitzeschockantwort (Naberhaus und Bahl, 1992; Bahl, 1993; Sauer und Dürre 1993) besteht, könnten die potentiellen Regulatoren des *adc*-Gens auch hierauf einen Einfluß haben, was ihr Vorkommen in *B. subtilis* erklären würde. Die Proteine aus *C. acetobutylicum* und *B. subtilis*

weisen signifikante Sequenzhomologien auf (>25%). Proteine mit signifikanter Homologie besitzen häufig sehr ähnliche dreidimensionale Strukturen (Richardson et al., 1992), was ebenfalls darauf hinweisen könnte, daß die AdcR- und AdcS-homologen Proteine in *B. subtilis* dort auch eine regulatorische Funktion besitzen. Nahezu 100 %ige Sequenzhomologie besteht am N-Terminus der Proteine AdcR und YhbD, was dem Protein aus *B. subtilis* ebenfalls ein N-terminales *helix-turn-helix* Motiv der MerR-Proteinfamilie zuordnet. Eine transmembrane Domäne, wie sie für das AdcR-Protein angenommen werden kann, findet sich im *B. subtilis*-Protein jedoch nicht. Welche Funktion die Proteine YhbD, YhbE und YhbF in *B. subtilis* innehaben, ist dort verhältnismäßig leichter zu untersuchen als in *C. aceto-butylicum*, da *B. subtilis* als Gram-positiver Modellorganismus der Molekularbiologie gilt und damit das Gegenstück zum Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* darstellt. Modellorganismen zeichnen sich dadurch aus, daß alle gängigen mikro- und molekularbiologischen Methoden standardmäßig auf sie anwendbar sind. Auch die Manipulation chromosomal codierter Gene gehört damit in *B. subtilis* zum Standardrepertoire, während diese Methode bei *C. aceto-butylicum* noch in den Anfängen steckt. Unterschiedliche Experimente diesbezüglich blieben in dieser Arbeit ohne Erfolg. Dies ist wahrscheinlich im schlechten Rekombinationsverhalten von *C. acetobutylicum* begründet. Das Ausschalten der Gene *yhbD*, *yhbE* und *yhbF* könnte damit zum einen die Funktion der zugehörigen Genprodukte in *B. subtilis* zeigen und zum anderen erste Hinweise auf die Funktion der entsprechenden homologen Proteine in *C. acetobutylicum* geben. Bisherige Versuche zur Deletion der genannten Gene in *B. subtilis* (Lederle, 2005) blieben jedoch ebenfalls erfolglos.

#### 4.4 Das polycistronische *sol*-Operon

Das polycistronische *sol*-Operon ist neben dem *adc*-Operon das zweite auf dem Megaplasmid pSOL1 gelegene Operon, dessen Genprodukte an der Lösungsmittelbildung beteiligt sind.

#### 4.5 Regulation des *sol*-Operons

Für die Regulation des *sol*-Operons spielt die ausgeprägte nicht translatierte Region vor dem ersten Strukturgen des Operons eine entscheidende Rolle. Mit einer Länge von 246 Bp ist diese Region deutlich größer als die des *adc*-Gens (91 Bp; Gerischer und Dürre, 1992) und die der Gene *bdhA* und *bdhB* (36 Bp bzw. 39 Bp; Walter et al., 1992). Letzteres sind chromosomal codierte Gene, die

ebenfalls an der Lösungsmittelbildung beteiligt sind. Der intergene Bereich stromaufwärts des *sol*-Operons zeigt einige Auffälligkeiten in der Sequenz (Thormann et al., 2002). Zum einen konnte eine Spo0A-Bindestelle (0A-Box) und zum anderen eine dreifache Sequenzwiederholung (R1(distal)-R3(proximal)), wobei eine (R3) mit der 0A-Box überlappt, identifiziert werden. Die Beteiligung des globalen Regulators Spo0A an der Regulation des *sol*-Operons über seine Bindung an die 0A-Box konnte eindeutig gezeigt werden. Bereits 1995 wurde Spo0A von Wilkinson et al. als Regulator der Lösungsmittelbildung und Sporulation in *C. beijerinckii* diskutiert. Studien von Ravagnani et al. (2000) belegen diese Vermutung. Die Inaktivierung von *spo0A* in *C. beijerinckii* führt zu einem Phänotyp, der weder in der Lage ist, Lösungsmittel und Granulose zu produzieren noch zu sporulieren. In den letzten Jahren konnte die Vermutung auch für *C. acetobutylicum* bestätigt werden. Gelretardationsexperimente mit dem gereinigten phosphorylierten Spo0A-Protein aus *C. acetobutylicum* zeigen, daß es definitiv an der Regulation der sporulationsspezifischen Gene *spo0A*, *abrB* und *spolIG* und der für die Lösungsmittelbildung notwendigen Operone *sol* und *adc* beteiligt ist (Hollergschwandner, 2003). Spo0A stellt somit als globaler Regulator das lange postulierte Bindeglied zwischen der Lösungsmittelbildung und Sporulation dar. Es muß jedoch bezweifelt werden, daß Spo0A allein für die transkriptionelle Induktion der Lösungsmittelbildung verantwortlich ist. Dagegen sprechen Inaktivierungs-experimente von *spo0A* (Harris et al., 2002), Reporterstudien zur Expression des *sol*-Operons nach Mutation und/oder Deletion der stromaufwärts liegenden 0A-Box (Thormann et al., 2002; Feustel, 2004) und Gelretardationsexperimente mit gereinigtem phosphorylierten Spo0A-Protein (Hollergschwandner, 2003). Eine eindeutige Identifizierung weiterer Transkriptionsregulatoren des *sol*-Operons war bisher jedoch nicht möglich. Studien von Feustel (2004) und aktuelle Experimente (Niklas Nold, mündliche Mitteilung) lassen jedoch Spekulationen über die Beteiligung von CcpA und/oder CodY an der Regulation zu.

Für die Regulation des *sol*-Operons gilt demnach wie auch für das *adc*-Operon, daß das globale Regulatorprotein Spo0A zwar an der Regulation beteiligt ist, daß es keinesfalls aber allein für die Regulation verantwortlich sein kann. Im Fall beider Operone ist mindestens ein weiterer, wahrscheinlich DNA-bindender Transkriptionsfaktor an der Regulation beteiligt. Es ist anzunehmen, daß es sich dabei für jedes Operon um individuelle Transkriptionsregulatoren handelt, da sich die diskutierten, potentiellen Bindestellen in den jeweiligen Promoterbereichen unterscheiden. Derartige Proteine könnten auch eine Erklärung für zwei weitere Phänomene in *C. acetobutylicum* liefern: 1. Die Lösungsmittelbildung und die Sporulation hängen zwar zusammen, aber die Lösungsmittelbildung ist keine Voraussetzung für die Sporulation. 2. Unter entsprechenden Wachstumsbe-

dingungen kann das Verhältnis von Aceton- zu Butanolkonzentration sehr stark variieren (alkohologene Fermentation: keine Acetonbildung), ohne daß die Sporulation dadurch beeinflusst wird.

#### **4.5.1 Das Regulatorprotein Spo0A im Hefe-Ein-Hybrid-System**

Eine elegante Methode zum Nachweis und auch zur Identifizierung von DNA-bindenden Proteinen bietet das Hefe-Ein-Hybrid-System (*yeast one-hybrid system*, Y1H). Als eine Abwandlung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (*yeast two-hybrid system*, Y2H), das Anfang der 90er Jahre von Fields und Song (1989) entwickelt wurde, ermöglicht es die *in vivo*-Detektion von DNA-Protein-Interaktionen in Hefezellen. Dazu wird die postulierte Bindesequenz (*bait*-Sequenz) vor ein Reporter-gen kloniert, das zur Aktivierung ein hefeeigenes Aktivierungsprotein benötigt. Ein Hybrid-Protein (*prey*-Protein) bestehend aus dem Protein, dessen Bindung untersucht werden soll, und dem o. g. Aktivatorprotein kann anschließend in den Hefezellen auf seine Interaktion mit der *bait*-Sequenz untersucht werden. Bei erfolgreicher Bindung kommt es zur Aktivierung der Reporter-genexpression. Eine in dem Fusionsvektor für die Herstellung des *prey*-Hybrids angelegte Genbank ermöglicht die Identifizierung neuer DNA-bindender Proteine. Für die Untersuchung von Proteinen aus *C. acetobutylicum* wurde das Hefe-Ein-Hybrid-System bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht eingesetzt, so daß unklar war, ob sich die Methode eignet. Da die Bindung stromaufwärts des *sol*-Operons zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente noch nicht eindeutig geklärt war, wurde diese postulierte Bindung parallel in Gelretardations-experimenten (durchgeführt von Concha Hollergschwandner) und im Hefe-Ein-Hybrid-System untersucht. Hollergschwandner (2003) konnte die Bindung des Spo0A-Proteins an die 0A-Box im intergenen Bereich des *sol*-Operons eindeutig nachweisen. Der Nachweis der Bindung des Proteins im Hefe-Ein-Hybrid-System war nicht möglich. Diese Methode ist demzufolge nicht geeignet, die Bindung des Proteins Spo0A zu untersuchen, was sich höchstwahrscheinlich dadurch erklären läßt, daß das Protein in den Hefezellen nicht phosphoryliert und damit nicht aktiviert wird. Spo0A stellt einen globalen Transkriptionsfaktor dar, der in *Bacillus* und *Clostridium* (Brown et al., 1994) beschrieben wurde. Die DNA-bindende Aktivität des Proteins wird über die Phosphorylierung der N-terminalen Domäne reguliert. Eine nicht stattfindende Phosphorylierung könnte entweder darin begründet sein, daß das zur Phosphorylierung notwendige Protein, vermutlich eine Kinase, die jedoch in *C. acetobutylicum* bis jetzt noch nicht genauer bestimmt werden konnte, in Hefezellen nicht vorkommt und daß eventuell dort vorhandene andere Kinasen nicht in der Lage sind, das Spo0A-Protein zu phosphorylieren, oder aber die N-terminale Phosphorylierungsstelle ist durch die Herstellung des

Fusionsproteins für die Phosphorylierung nicht mehr zugänglich. Es hatte auf Grund dieser Ergebnisse wenig Sinn, zunächst angestrebte Experimente im Hefe-Zwei-Hybrid-System, die Aufschluß über mögliche Interaktionspartner von Spo0A geben könnten, durchzuführen. Hier sollte vielmehr eine Methode der Affinitätschromatographie gewählt werden, die auf dem gereinigten phosphorylierten Spo0A-Protein beruht, dessen Aktivität eindeutig nachgewiesen ist (Hollergschwandner, 2003). Die Kopplung dieses Proteins an eine Matrix und eine Inkubation mit Rohextrakt aus *C. acetobutylicum* könnte nach geeigneten Waschschritten die Elution und Identifikation möglicher Interaktionspartner erlauben. Damit sind das Hefe-Ein- und das Hefe-Zwei-Hybrid-System zwar im Allgemeinen elegante Methoden, um DNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, lassen sich jedoch nicht allgemeingültig anwenden. Wie hier aufgezeigt werden konnte, eignen sie sich nicht, wenn prokaryotische Proteine einer posttranslationalen Modifikation bedürfen, die in Eukaryoten nicht möglich ist. Ebenfalls schwierig wird es, wenn die prokaryotischen Proteine für die Bindung einen Cofaktor benötigen, der in Eukaryoten nicht vorkommt. Die Technik der Ein- und Zwei-Hybrid-Systeme hat sich in den letzten Jahren rasant entwickelt. Vor allem bakterielle Ein- (Hu et al., 2000; Meng et al., 2005) und Zwei- (Karimowa et al., 1998; Kronacker et al., 1998; Hu et al., 2000; Young et al., 2000) Hybrid-Systeme erfreuen sich besonderer Aufmerksamkeit. Auch die parallele Untersuchung im pro- und eukaryotischen System (Serebriiskii et al., 2005), ohne dabei das Klonierungssystem wechseln zu müssen, ist mittlerweile möglich. Die Anwendung prokaryotischer Systeme auf den Regulator Spo0A könnte das oben aufgeführte Problem der Phosphorylierung lösen. Liegt das Problem jedoch nicht in der Phosphorylierung selbst, sondern in der Unzugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle, so würde auch das Umsteigen auf ein bakterielles System nur dann verwertbaren Ergebnisse liefern, wenn wie bei Hollergschwandner (2003) die N-terminale Domäne des Spo0A-Proteins derart verändert wird, daß die Aktivität des Proteins unabhängig von einer Phosphorylierung ist (sam (spo0A-Mutation)-Mutanten, Hollergschwandner, 2003). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß ein pro- und/oder eukaryotisches Ein-Hybrid-System bei der Suche von weiteren potentiellen DNA-bindenden Transkriptionsregulatoren helfen könnte, die an der Regulation des *sol*- oder *adc*-Operons beteiligt sind, da nicht alle Transkriptionsregulatoren notwendigerweise einer postrationalen Modifikation bedürfen. Eine alternative Methode bietet die DNA-Affinitätschromatographie, die in dieser Arbeit zur Identifikation der Proteine AdcR und AdcS führte. Auch für das *sol*-Operon wurde sie bereits angewandt und führte zur Identifikation der potentiellen Regulatoren CcpA und CodY. Sollte sich jedoch keines der genannten Proteine als Regulator bestätigen, so wäre für eine erneute Suche die Methode des Ein-Hybrid-Systems der DNA-Affinitätschromatographie vorzuziehen, da die Nach-

weisgrenze der Färbung der SDS-PAGE sowie die aufwendige MALDI-TOF-Analyse umgangen werden können. Jedes bindende Protein im Ein-Hybrid-System kann identifiziert werden, da lediglich der zugehörige Fusionsvektor sequenziert werden muß.

## 5a. Zusammenfassung

Die Aufklärung der Regulationsvorgänge der Lösungsmittelbildung von *Clostridium acetobutylicum* stellt ein zentrales Thema der Forschung dar. Die Untersuchungen dieser Arbeit konzentrierten sich auf die Promotorregionen der beiden Transkriptionseinheiten *sol*- und *adc*-Operon, die als Hauptangriffsstellen der Regulation durch DNA-bindende Proteine vermutet werden.

1. Das Protein CAP0037 konnte in der DNA-Affinitätschromatographie als DNA-bindendes Protein des *adc*-Promoterbereichs identifiziert werden. CAP0037 stellt damit einen potentiellen Transkriptionsregulator dieses Gens dar und erhielt den Namen AdcR (*adc* Regulator).

2. Computergestützte Analysen zeigten, daß das AdcR-Protein mit seiner molekularen Masse von 24 kDa durch ein N-terminales *helix-turn-helix*-Motiv (Position 7-81) und eine weiter C-terminal positionierte potentielle transmembrane Domäne (Position 162-184) charakterisiert ist.

3. Das *adcR*-Gen (*cap0037*, 629 Bp) ist auf dem Megaplasmid von *C. acetobutylicum* lokalisiert und bildet, wie RT-PCR-Analysen zeigten, ein Operon mit dem 19 Bp stromabwärts beginnenden Gen *cap0036* (728 Bp), das die Bezeichnung *adcS* erhielt. Das *adcR/adcS*-Operon befindet sich in direkter Nähe des *adhE2*-Gens, das für eine zweite bifunktionelle Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase in *C. acetobutylicum* codiert. 34 Bp stromaufwärts des *adcR/adcS*-Operon läßt sich eine potentielle reverse Spo0A-Bindestelle (0A-Box) identifizieren. Erste Versuche lassen vermuten, daß eine Bindung des globalen Regulators Spo0A aus *C. acetobutylicum* an diese 0A-Box anzunehmen ist, wodurch er an der Regulation dieses Operons beteiligt sein könnte.

4. AdcR-/AdcS-homologe Proteine und *adcR*-/*adcS*-homologe Gene finden sich in *Bacillus subtilis* (YhbDEF, *yhbDEF*). Im Fall der Proteine liegen Sequenzidentitäten von 11-37 % und im Fall der Gene von 35-50 % vor. Die Funktion der Proteine in *B. subtilis* ist unbekannt.

5. Rekombinante Stämme von *C. acetobutylicum*, die *sense*- bzw. *antisense*-Plasmide des Gens *adcR* bzw. *adcS* besitzen, zeigten, daß die Überproduktion des Proteins AdcR zu einer verminderten und die Überproduktion des Proteins AdcS zu einer erhöhten Bildung von Aceton führen. Für das AdcR-Protein kann damit eine reprimierende und für das AdcS-Protein eine aktivierende Funktion angenommen werden. Inaktivierungsversuche der Gene *adcR* und *adcS* zur

Herstellung von *C. acetobutylicum*-Integrations- oder -Deletionsmutanten blieben erfolglos.

6. Die heterologe Überproduktion der Proteine AdcR und AdcS in *Escherichia coli* als *his-tag*-Fusionsproteine war erfolgreich. Nach der Reinigung an einer Ni-NTA-Matrix konnten Proteinkonzentrationen von 500 µg/ml für AdcR x 6His und 2,5 mg/ml für AdcS x 6His bestimmt werden. Auch das Protein Spo0A konnte als *his-tag*-Fusionsprotein in *E. coli* überproduziert werden und nach der Reinigung wurden 500 µg/ml Protein erhalten. Die schlechte Reinigung des Proteins AdcR x 6His könnte in der potentiellen Membranständigkeit des Proteins begründet sein. Dafür sprechen Versuche, die zeigten, daß das heterolog überproduzierte Protein auch in der Membranfraktion von *E. coli* nachzuweisen ist.

7. Gelretardationsexperimente zeigten, daß die Fusionsproteine AdcR x 6His und AdcS x 6His konzentrationsabhängig an die Promoterregion des *adc*-Gens binden. Die Spezifität der Bindung bleibt jedoch ungeklärt. Die Vermutung, daß die Spezifität der Bindung des AdcR x 6His-Proteins durch das AdcS x 6His-Protein vermittelt wird, konnte weder bestätigt, noch widerlegt werden. Der Einfluß von Spo0A x 6His auf die Bindung der Proteine AdcR x 6His und AdcS x 6His ist ebenfalls ungeklärt.

8. Die These von Böhringer (2002), daß der Bereich stromabwärts der -10-Region der Bindeort für einen potentiellen transkriptionsaktivierenden Regulator sein könnte, konnte widerlegt werden. Das Protein AdcR x 6His bindet sowohl in der DNA-Affinitätschromatographie, als auch in den Gelretardationsexperimenten an die native und die stromabwärts der -10-Region verkürzte Sequenz des *adc*-Promoterbereichs.

9. Als potentielle Bindestellen der Proteine AdcR und AdcS können von Nakotte (1998) untersuchte Sequenzen im *adc*-Promoterbereich diskutiert werden. Es handelt sich dabei um ein Heptamermotiv und eine palindromische Sequenz, für die entgegengesetzte Einflüsse auf die Transkription des *adc*-Gens gezeigt werden konnten. Entsprechend könnte AdcS als Aktivator an das Heptamermotiv und AdcR als Repressor an die palindromische Sequenz binden.

10. Das AdcR-Protein kann auf Grund seiner Struktur bestimmten Proteinfamilien zugeordnet werden.

A) Das *helix-turn-helix*-Motiv ordnet das AdcR-Protein der Familie der MerR-Proteine zu. Ein Regulationsmechanismus des AdcR-Proteins ähnlich dem

- Mechanismus des MerR-Proteins aus *E. coli* oder des TipAL-Proteins aus *Streptomyces lividans* wäre denkbar.
- B) Das Vorkommen eines *helix-turn-helix*-Motivs und einer transmembranen Domäne läßt das AdcR-Protein dem ToxR-Protein aus *Vibrio cholerae* ähneln. Das ToxR-Protein ist u. a. an der Regulation des *toxT*-Gens beteiligt. Ein ähnlich kompliziertes Regulationsnetzwerk wie das zur Regulation des *toxT*-Gens könnte möglicherweise auch für das *adc*-Gen zutreffen.
- C) Das AdcR-Protein ähnelt von seiner Struktur einem ECF-Anti-Sigmafaktor. Da AdcS-Protein jedoch, wie die Versuche zeigten, keinen Sigmafaktor darstellt, kann eine Funktion von AdcR als Anti-Sigmafaktor nahezu ausgeschlossen werden.

11. Das Hefe-Ein-Hybrid-System ist zwar eine elegante Methode, um DNA-Protein-Interaktionen nachzuweisen, lässt sich jedoch für die Untersuchung der Bindung des globalen Regulators Spo0A aus *C. acetobutylicum* an die DNA nicht anwenden.

## 5b. Summary

A very important subject in studying *Clostridium acetobutylicum* is the identification of mechanisms of regulation of solvent production. Most interesting for the regulation are the promoter regions of the *sol* and the *adc* operon which are in the focus of this work.

1. The protein CAP0037 identified by DNA affinity chromatography could be a putative transcriptional regulator of the *adc* gene. Hence, the protein was named AdcR (*adc* regulator).

2. Computational analysis showed that the AdcR protein has a molecular mass of about 24 kDa. Furthermore, the protein is characterized by a N-terminal helix-turn-helix motif (position 7-81) and a transmembrane segment at the C terminus (position 162-184).

3. The *adcR* gene (*cap0037*, 629 bp) is localized on the megaplasmid pSOL1 of *C. acetobutylicum*. RT-PCR analysis revealed the operon structure of the *adcR* gene and the gene starting 19 bp further downstream, the gene *cap0036* (728 bp). The latter was named *adcS*. The *adcR/adcS* operon is located near the *adhE2* gene coding for a second bifunctional aldehyde-/alcohol-dehydrogenase in *C. acetobutylicum*. A putative Spo0A binding site (0A box) could be identified 34 bp upstream of the *adcR* gene. A binding of the global regulator Spo0A to this 0A box could be demonstrated in bandshift experiments. For this reason, Spo0A might be involved in the regulation of the *adcR/adcS* operon.

4. Homologous proteins of AdcR and AdcS and also homologous genes of *adcR* and *adcS* could be identified in *Bacillus subtilis* (YhbDEF, *yhbDEF*). The identities of the amino acid sequences range between 11-37 % and the identities of the nucleotide sequences range between 35-50 %. The function of the proteins in *B. subtilis* is still unknown.

5. Recombinant strains of *C. acetobutylicum* harbouring a sense or antisense plasmid of the genes *adcR* or *adcS* showed differences in acetone production in comparison with the wildtype strain. A strain overproducing the AdcR protein produced more acetone, whereas a strain overproducing AdcS produced less acetone. Thus, the protein AdcS seems to be an activator of transcription and the protein AdcR seems to be a repressor of transcription. The generation of integration or deletion mutants of *C. acetobutylicum* of the respective genes failed.

6. The proteins AdcR and AdcS were overproduced in *Escherichia coli* as his-tag fusion proteins. After purification using a Ni-NTA matrix, the protein AdcR x 6His had a concentration of 500 µg/ml and the protein AdcS had a concentration of 2,5 mg/ml. The protein Spo0A was overproduced and purified in the same way, resulting in a protein concentration of 500 µg/ml. The effectiveness of purification was less for the protein AdcR x 6His. This was probably due to the membrane association of the protein. An indication therefore is given by the experiment which identified the AdcR protein in the membrane fraction of *E. coli*.

7. The concentration-dependent binding of the proteins AdcR x 6His and AdcS x 6His was shown in bandshift assays. The specificity of the binding could not be determined. The speculation that the binding specificity of the protein AdcR x 6His is dependent on the AdcS x 6His protein could neither be confirmed nor disproven. The effect of Spo0A x 6His in the binding of the proteins AdcR x 6His and AdcS x 6His is still unknown.

8. It was supposed by Böhringer (2002) that a putative transcriptional regulator of the *adc* gene binds downstream of the -10 region. The proven binding of the protein AdcR to the native and deleted *adc* promoter region shown in the DNA affinity chromatography and in bandshift assays disproves this hypothesis.

9. Putative binding sites for the proteins AdcR and AdcS can be discussed using the results of Nakotte (1998). A heptamer motif and a palindromic sequence in the *adc* promoter region showed divergent effects on the transcription efficiency of the *adc* gene. It could be speculated that AdcS as a potential activator of transcription binds to the heptamer motif and AdcR as a potential repressor of transcription binds to the palindromic sequence.

10. The structure attributes the AdcR protein to different protein families.

- A) Because of the typical helix-turn-helix motif the AdcR protein is a member of the MerR protein family. The mechanism of regulation of the protein might resemble the mechanism of the MerR protein from *E. coli* or the mechanism of the TipAL protein from *Streptomyces lividans*.
- B) The appearance of a helix-turn-helix motif and a transmembrane segment is also shown for the ToxR protein from *Vibrio cholerae*. The protein is involved in the regulation of the *toxT* gene. A complex regulatory network as shown for the *toxT* gene could probably also be true for the *adc* operon.
- C) AdcR first seemed to be a ECF antisigma factor. However, because of AdcS being no sigma factor, this can be excluded. Maybe the protein

partners AdcR and AdcS interact in a way similar to a ECF sigma factor and its antisigma factor.

11. In general, the yeast one-hybrid system is a simple and efficient method to determine DNA-protein interactions. However, the method is not suitable to examine the interaction between the global regulator Spo0A from *C. acetobutylicum* and its cognate DNA.

## 6. Literatur

**Ahmed, M., L. Lyass, P. N. Markham, S. Taylor, N. Vazques-Lasloyp und A. A. Neyfakh.** 1995. Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.* **177**: 3904-3910.

**Albright, L. M., E. Huala und F. M. Ausubel.** 1989. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 311-336.

**Ansari, A. Z., J. E. Bradner und T. V. O'Halloran.** 1995. DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature* **374**: 371-375.

**Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidmann, J. A. Smith und K. Struhl.** 1997. *Current protocol in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.

**Bachmann, B. J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8, *Microbiol. Rev.* **54**: 130-197.

**Bahl, H., W. Andersch und G. Gottschalk.** 1982. Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 201-205 (Erratum **17**: 73,1983).

**Bahl, H., M. Gottwald, A. Kuhn, V. Rale, W. Andersch und G. Gottschalk.** 1986. Nutritional factors affecting the ratio of solvents produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 764-770.

**Bahl, H.** 1993. Heat shock response and onset of solvent formation in *Clostridium acetobutylicum*. In: *The clostridia and biotechnology* (D. R. Woods, Hrsg.), Butterworth-Heinemann, Stoneham, USA, S. 247-259.

**Baldus, J. M., B. D. Green, P. Youngman und C. P. Moran; Jr.** 1982. Phosphorylation of *Bacillus subtilis* transcription factor Spo0A stimulates transcription from the *spoIIIG* promoter by enhancing binding to weak 0A boxes. *J. Bacteriol.* **176**: 296-309.

- Bartel, P. L., C.-T. Chien, R. Sternglanz und S. Fields.** 1993. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: Cellular interactions in development: a practical approach (D. A. Hartley, Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, S. 153-179.
- Bennett, G. N., und F. B. Rudolph.** 1995. The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiol. Rev. **17**: 241-249.
- Bertram, J., und P. Dürre.** 1989. Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. Arch. Microbiol **142**: 1273-1279.
- Bertram, J., A. Kuhn und P. Dürre.** 1990. Tn916-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in regulation of solvent formation. Arch. Microbiol. **153**: 373-377.
- Betley, M. J., V. L. Miller und J. J. Mekalanos.** 1986. Genetics of bacterial enterotoxins. Ann. Rev. Microbiol. **40**: 577-605.
- Blanc-Potard, A., F. Solomon, J. Kayser und E. A. Groisman.** 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. J. Bacteriol. **181**: 998-1004.
- Blum, H., H. Beyer und H. J. Groß.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA. Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1522.
- Böhringer, M.** 2002. Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zur Regulation des Gens der Acetacetat-Decarboxylase von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.
- Bouret, R. B., K. A. Borkovich und M. I. Simon.** 1991. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem. **60**: 401-441.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Breeden, L., und K. Nasmyth.** 1985. Regulation of the yeast HO gene. Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. **50**: 643-650.

- Brown, D. P., L. Ganova-Raeva, B. D. Green, S. R. Wilkinson, M. Young und P. Youngman.** 1994. Characterization of Spo0A homologs in diverse *Bacillus* and *Clostridium* species reveals regions of high conservation within the effector domain. *Mol. Microbiol.* **14**: 411-426.
- Brown, N. L., J. V. Stoyanov, S. P. Kidd und J. L. Hobman.** 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 145-163.
- Bucca, G., Z. Hindle und C. P. Smith.** 1997. Regulation of the *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is governed by HspR, an autoregulatory repressor protein. *J. Bacteriol.* **179**: 5999-6004.
- Burbulys, D., K. A. Trach und J. A. Hoch.** 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Burchard, G., und H. Bahl.** 1991. Cloning and analysis of the  $\beta$ -galactosidase-encoding gene from *Clostridium thermosulfurigenes* EM1. *Gene* **106**: 13-19.
- Cary, J. W., D. J. Petersen, E. T. Papoutsakis und G. B. Bennett.** 1990. Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 acetoacetyl-coenzyme A:acetate/butyrate:coenzyme A-transferase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1576-1583.
- Clontech.** 1997. MATCHMAKER One-hybrid system-user manual. Clontech Laboratories, Inc., USA.
- Clontech.** 2000. Yeast protocols handbook. Clontech Laboratories, Inc., USA.
- Cornillot, E., E. V. Nair, E. T. Papoutsakis und P. Soucaille.** 1997. The genes of butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. *J. Bacteriol.* **179**: 5442-5447.
- De Las Penas, A., L. Conolly und C. A. Gross.** 1997a. The  $\sigma^E$ -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of  $\sigma^E$ . *Mol. Microbiol.* **24**: 373-386.
- De Las Penas, A., L. Conolly und C. A. Gross.** 1997b.  $\sigma^E$  is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 6862-6864.

**Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucl. Acids Res. **16**: 6127-6145.

**Dürre, P., H. Bahl und G. Gottschalk.** 1992. Die Aceton-Butanol-Gärung: Grundlage für einen modernen biotechnologischen Prozeß? Chem.-Ing.-Tech. **64**: 491-498.

**Dürre, P., R.-J. Fischer, A. Kuhn, K. Lorenz, W. Schreiber, B. Stürzenhofecker, S. Ullmann, K. Winzer und U. Sauer.** 1995. Solventogenic enzymes of *Clostridium acetobutylicum*: catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. FEMS Microbiol. Rev. **17**: 251-262.

**Dürre, P., M. Böhringer, S. Narkotte, S. Schaffer, K. Thormann und B. Zickner.** 2002. Transcriptional regulation of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **4**: 295-300.

**Enguita, F. J., J. L. de la Fuente, J. F. Martin und P. Liras.** 1996. An inducible expression system of histidine-tagged proteins in *Streptomyces lividans* for one-step purification by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography. FEMS Microbiol. Lett. **137**: 135-140.

**Enz, S., V. Braun und J. H. Crosa.** 1995. Transcription of the region encoding the ferric dicitrate-transport system in *Escherichia coli*: similarity between promoters for *fecA* and for extracytoplasmic function sigma factors. Gene **163**: 13-18.

**Feustel, L.** 2004. Molekularbiologische Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *sol*-Operons von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.

**Fields, S., und O. Song.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature **340**: 245-246.

**Fischer, R.-J., J. Helms und P. Dürre.** 1993. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. J. Bacteriol. **175**: 6959-6969.

**Fischer, R.-J.** 1994. Klonierung, Sequenzierung, molekulare Charakterisierung und Mutagenese von Genen der Lösungsmittelbildung aus *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Göttingen.

**Fridovich, I.** 1972. Acetoacetate decarboxylase. In: The enzymes (P. D. Boyer Hrsg.), Academic Press New York and London, Vol. VI, S. 255-270.

**Gabriel, C. L.** 1928. Butanol fermentation process. Ind. Eng. Chem. **20**: 1063-1067.

**Gallegos, M.-T., R. Schleif, A. Baroch, K. Hofmann und J. L. Ramos.** 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 393-410.

**Gapes, J. R.** 2000. The economics of acetone-butanol fermentation: theoretical and market considerations. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **2**: 27-32.

**Gerischer, U., und P. Dürre.** 1990. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the acetoacetate decarboxylase gene region from *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. **172**: 6907-6918.

**Gerischer, U., und P. Dürre.** 1992. mRNA analysis of the *adc* gene region of *Clostridium acetobutylicum* during the shift to solventogenesis. J. Bacteriol. **174**: 426-430.

**Gietz, D., A. St. Jean, R. A. Woods und R. H. Schiestl.** 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucl. Acids Res. **20**: 1425.

**Girbal, L., und P. Soucaille.** 1998. Regulation in solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. Trends Biotechnol. **16**: 11-16.

**Godin, C., und J. M. Engasser.** 1990. Two-stage continuous fermentation of *Clostridium acetobutylicum*: effects of pH and dilution rate. Appl. Microbiol. Biotechnol. **33**: 269-273.

**Gorham, H. C., S. J. McGowan, P. R. Robson und D. A. Hodgson.** 1996. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. Mol. Microbiol. **19**: 171-186.

**Gottschalk, J. C., und J. G. Morris.** 1981. The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate. FEMS Microbiol. Lett. **12**: 385-389.

- Grimsley, J. K., R. B. Tjalkens, M. A. Strauch, T. H. Bird, G. B. Spiegelman, Z. Hostomsky, J. M. Whiteley und J. A. Hoch.** 1994. Subunit composition and domain structure of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **269**: 16977-16982.
- Grupe, H., und G. Gottschalk.** 1992. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation for a model for shift induction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3896-3902.
- Harley, C. B., und R. P. Reynolds.** 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucl. Acids. Res.* **15**: 2343-2361.
- Harris, L. M., N. E. Welker und E. T. Papoutsakis.** 2002. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **184**: 3586-3597.
- Häse, C. C., und J. J. Mekalanos.** 1998. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 730-734.
- Hershberger, C. D., R. W. Ye, M. R. Parsek, Z.-D. Xie und A. M. Chakrabarty.** 1995. The *algT* (*algU*) gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative  $\sigma$  factor ( $\sigma^E$ ). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7941-7945.
- Hill, J., K. A. Donald und D. E. Griffiths.** 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucl. Acids Res.* **19**: 5791.
- Hollergschwandner, C.** 2003. Unterschiede in der Regulation der Sporulation von *Clostridium acetobutylicum* und *Bacillus subtilis*. Dissertation, Universität Ulm.
- Holmes, D. J., J. L. Caso und C. J. Thompson.** 1993. Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* **12**: 3183-3191.
- Hu, J. C., M. G. Kronacker und A. Hochschild.** 2000. *Escherichia coli* one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions. In: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **20**: 80-94.

- Hüsemann, M. H. W., und E. T. Papoutsakis.** 1986. Effect of acetoacetate, butyrate, and uncoupling ionophores on growth and product formation of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Lett.* **8**: 37-42.
- Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ito, H., Y. Fukada, K. Murata und A. Kimura.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Jewell, J. B., J. B. Coutinho and A. M. Kropinski.** 1986. Bioconversion of propionic, valeric, and 4-hydroxybutyric acids into the corresponding alcohols by *Clostridium acetobutylicum* NRRL 527. *Curr. Microbiol.* **13**: 215-219.
- Jones, D. T., A. Westhuizen, S. Long, E. R. Allock, S. J. Reid und D. R. Woods.** 1982. Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1434-1438.
- Jones, D. T.** Präsentation beim *9th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms* (GLM), 1.-5. Juli 2002, Gyeongju, Korea.
- Joung, J. K., E. I. Ramm und C. O. Pabo.** 2000. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7382-7387.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann und D. Ladant.** 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5752-5756.
- Keis, S., C. F. Bennett, V. K. Ward und D. T. Jones.** 1995. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** :693-705.
- Keis, S., R. Shaheen und D. T. Jones.** 2001a. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *Int. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2095-2103.

**Keis, S., J. T. Sullivan and D. T. Jones.** 2001b. Physical and genetic map of the *Clostridium saccharobutylicum* (formerly *Clostridium acetobutylicum*) NCP 262 chromosome. *Microbiology* **147**: 1909-1922.

**Kronacker, M. G., B. Rensburg und R. Menzel.** 1998. Gene activation by the AraC protein can be inhibited by DNA looping between AraC and LexA repressor that interacts with AraC: possible application as a two-hybrid system. *Mol. Microbiol.* **30**: 615-624.

**Krukonis, E. S., R. R. Yu und V. J. DiRita.** 2000. The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol. Microbiol.* **38**: 67-84.

**Kyhse-Andresen, J.** 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209.

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

**Lederle, S.** 2005. Funktionale Charakterisierung des *yhbDEF*-Operons aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Universität Ulm.

**Lee, S. Y., G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis.** 1993. Determination of plasmid copy number and stability in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 319-324.

**Lin, Y.-L., und H. P. Blaschek.** 1983. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 966-973.

**Lin, Z., K. Kumagai, K. Baba, J. J. Mekalanos und M. Nishibuchi.** 1993. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS*-operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J. Bacteriol.* **175**: 3844-3855.

**Liu, J., T. E. Wilson, J. Milbrandt und M. Johnston.** 1993. Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. In: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **5**: 125-137.

**Liu, W., Y. Qi und F. M. Hulett.** 1998. Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Mol. Microbiol.* **28**: 119-130.

**Lonetto, M., K. L. Brown, K. E. Rudd und M. J. Buttner.** 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7573-7577.

**McCleary, W. R., J. B. Stock und A. J. Ninfa.** 1993. Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* **175**: 2793-2798.

**Martinez-Salazar, J. M., S. Moreno, R. Najera, J. C. Boucher, G. Espin, G. Sorberon-Chavez und V. Deretic.** 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evolution of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**:1800-1808.

**Mekalanos, J. J., D. J. Swartz, G. D. N. Pearson, N. Hartford, F. Groyne und M. deWilde.** 1983. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* **306**: 551-557.

**Mekalanos, J. J.** 1985. Cholera toxin: genetic analysis, regulation, and role in pathogenesis. In: Genetic approaches to microbial pathogenicity (W. Goebel, Hrsg.), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **118**: 97-118.

**Meng, X., M. H. Brodsky und S. A. Wolfe.** 2005. A bacterial one-hybrid system for determining the DNA-binding specificity of transcription factors. *Nature Biotechnol. Lett.* **23**: 988-994.

**Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis.** 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *BioTechnol.* **10**: 190-195.

**Mermelstein, L. D., und E. T. Papoutsakis.** 1993. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage  $\Phi$ 3TI to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1077-1081.

- Merrell, D. S., und A. Camilli.** 2000. Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the 'ToxR-like' family of transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **182**: 5342-5350.
- Miller, V. L.** 1985. Analysis of the cholera toxin positive regulatory gene, *toxR*. Dissertation, Harvard Universität, Cambridge, Massachusetts.
- Miller, V. L., R. K. Taylor und J. J. Mekalanos.** 1987. Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a membrane DNA binding protein. *Cell* **48**: 271-279.
- Mimcevic, D., und J. R. Gapes.** 2000. The acetone-butanol fermentation in pilot plant and pre-industrial scale. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 15-20.
- Missiakas, D., M. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos und S. Raina.** 1997. Modulation of *Escherichia coli*  $\sigma^E$  (RpoE) heat shock transcription-factor activity by RseA, RseB and RseC proteins. *Mol. Microbiol.* **24**: 355-371.
- Missiakas, D., und S. Raina.** 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* **28**: 1059-1066.
- Mulligan, M. E., J. Brosius und W. R. McClure.** 1985. Characterization *in vitro* of the effect of spacer length on the activity of *Escherichia coli* RNA polymerase at the TAC promoter. *J. Biol. Chem.* **260**: 3529-3538.
- Mundson, G. P., und J. R. Scott.** 2000. Rns, a virulence regulator within the AraC family, requires binding sites upstream and downstream of its own promoter to function as an activator. *Mol. Microbiol.* **36**: 1391-1402.
- Mundson, G. P., L. G. Holcomb und J. R. Scott.** 2001. Novel group of virulence activators within the AraC family that are not restricted to upstream binding sites. *Infect. Immun.* **69**: 186-193.
- Murakami, T., T. G. Holt und C. J. Thompson.** Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **171**: 1459-1466.
- Naberhaus, F., und H. Bahl.** 1992. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **174**: 3282-3289.

**Nakotte, S.** 1998. Funktionelle Analyse von Regulationsstrukturen essentieller Gene für die Lösungsmittelbildung in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.

**Nakotte S., S. Schaffer, M. Böhringer und P. Dürre.** (1998). Electroporation of, plasmid isolation from, and plasmid conservation in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Appl Microbiol. Biotechnol. **50**: 564-567.

**Nasima, A., P. R. Herron, M. C. Evans und P. J. Dyson.** 2002. Osmotic regulation of the *Streptomyces lividans* thioestrepton-inducible promoter, *ptipA*. Microbiol. **148**: 381-390.

**Newberry, K. J., und R. G. Brennan.** 2004. The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. J. Bacteriol. **279**: 20356-20362.

**Neely, M. N., C. L. Dell und E. R. Olson.** 1994. Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli cad* operon. J. Bacteriol. **176**: 3278-3285.

**Nölling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, GTC Sequencing Center Production, Finishing, and Bioinformatics Teams, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin und D. R. Smith.** 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. **183**: 4823-4838.

**Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, J. Kupsch, M. Bergbauer und T. A. Trautner.** 1985. DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: structural relatedness and gene expression. Gene **35**: 143-150.

**Nunoshiba, T., E. Hidago, C. F. Amabile Cuevas und B. Demole.** 1992. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. J. Bacteriol. **174**: 6054-6060.

**Oelmüller, U., N. Krüger, A. Steinbüchel und C. Friedrich.** 1990. Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. J. Microbiol. Methods **11**: 73-81.

- O'Halloran, T. V., B. Frantz, M. K. Shin, D. M Ralston und J. G. Wright.** 1989. The MerR heavy-metal receptor mediates positive activation in a topologically novel transcription complex. *Cell* **56**: 119-129.
- Oultram, J. D., M. Loughlin, T.-J. Swinfield, J. K. Brehm, D. E. Thomson und N. P. Minton.** 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 83-88.
- Outten, C. E., E. W. Outten und T. V. O'Halloran.** 1999. DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**: 37517-37524.
- Petersen, D. J., und G. N. Bennett.** 1990. Purification of acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and cloning of the acetoacetate decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3491-3498
- Petersen, D. J., R. W. Welch, F. B. Rudolph und G. N. Bennett.** 1991. Molecular cloning of an alcohol (butanol) dehydrogenase gene cluster from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **173**: 1831-1834.
- Petersen, D. J., J. W. Cary, J. Vanderlyden und G. N. Bennett.** 1993. Sequence and arrangement of genes encoding enzymes of the acetone-production pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **123**: 93-97.
- Pernecky, S. J., und M. J. Coon.** 1996. N-terminal modifications that alter P450 membrane targeting and function. *Methods Enzymol.* **272**: 25-34.
- Priest, F. G.** 1993. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria (A. L. Sonenshein, J. A. Hoch und P. Losick, Hrsg.), ASM Press, Washington, D. C., USA.
- Qiagen.** 2003. The QIAexpressionist™ -a handbook für high level expression and purification of the 6xHis-tagged proteins. Edition 5, Qiagen GmbH, Hilden.
- Ravagnani, A., K. C. Jennert, E. Steiner, R. Grunberg, J. R. Jefferies, S. R. Wilkinson, D. I. Young, E. C. Tidswell, D. P. Brown, P. Youngman, J. G. Morris und M. Young.** 2000. Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia. *Mol. Microbiol.* **37**: 1172-1185.

**Reich, K. A., und G. K. Schoolnik.** 1994. The light organ symbiont *Vibrio fischeri* possesses a homolog of the *Vibrio cholerae* transmembrane transcriptional activator ToxR. J. Bacteriol. **176**: 3085-3088.

**Richardson, J. S., D. C. Richardson, N. B. Tweedy, K. M. Gernert, T. P. Quinn, M. H. Hecht, B. W. Erickson, Y. Yan, R. D. McClain und M. E. Donlan.** 1992. Looking at proteins: representations, folding, packing and design. Biophys. J. **63**: 1185-1209.

**Rogers, P.** 1986. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. Adv. Appl. Microbiol. **31**: 1-60.

**Rowen, D. W., und V. Deretic.** 2000. Membrane-to-cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. Mol. Microbiol. **36**: 314-327.

**Russel, D. R., und G. N. Bennett.** 1982. Construction and analysis of *in vivo* activity of *E. coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. Gene **20**: 231-243.

**Sadowsky, M. J., P. B. Cregan, M. Gottfert, A. Sharma, D. Gerhold, F. Rodriguez-Quinones, H. H. Keyser, H. Hennecke und G. Stacey.** 1991. The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 632-641.

**Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Ehrlich und N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science **230**: 1350-1354.

**Sambrook, J., D. W. Russel, N. Irwin und K. A. Janssen.** 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

**Sauer, U.** 1992. Klonierung, Sequenzierung und molekulare Charakterisierung regulatorischer Gene aus *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Göttingen.

**Sauer, U., und P. Dürre.** 1993. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding a small heat shock protein of *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. **175**: 3394-3400.

**Sauer, U., und P. Dürre.** 1995. Differential induction of genes related to solvent formation during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiol. Lett. **125**: 115-120.

**Schaffer, S.** 1999. Molekularbiologische Untersuchungen zum Lösungsmittelstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.

**Schaffer, S., N. Isci, B. Zickner und P. Dürre.** 2002. Changes in protein synthesis and identification of proteins specifically induced during solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. Electrophoresis **23**: 110-121.

**Schiestl, R. H., und R. D. Gietz.** 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. Curr. Genet. **16**: 339-346.

**Schreier, H. J., C. A. Rostkowski, J. F. Nomellini und K. D. Hirschi.** 1991. Identification of DNA sequences involved in regulating *Bacillus subtilis glnRA* expression by the nitrogen source. J. Mol. Biol. **220**: 241-253.

**Schurr, M. J., H. Yu, J. M. Martinez-Salazar, J. C. Boucher und V. Deretic.** 1996. Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. J. Bacteriol. **178**: 4997-5004.

**Serebriiskii, I., R. Fang, E. Latypova, R. Hopkins, C. Vinson, J. K. Joung und E. A. Golemis.** 2005. A combined yeast/bacteria two-hybrid system. Mol. Cell. Proteomics **4**: 819-826.

**Shah, M. M., S. K. Song, Y. Y. Lee und R. Torget.** 1991. Effect of pre-treatment on simultaneous saccharification and fermentation of hardwood into acetone/butanol. Appl. Biochem. Biotechnol. **29**: 99-109.

**Stefano, J. G., und J. D. Gralla.** 1982. Spacer mutations in the *lacP<sup>S</sup>* promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 1069-1072.

- Stock, J. B., A. J. Ninfa und A. M. Stock.** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-490.
- Summers, A. O.** 1992. Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* **174**: 3097-3101.
- Takano, E., J. White, C. J. Thompson und M. J. Bibb.** 1995. Construction of thioestrepton-inducible, high-copy number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* **166**: 133-137.
- Taylor, R. K., V. L. Miller, D. B. Furlong und J. J. Mekalanos.** 1987. Use of *phoA* gene fusion to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2833-2837.
- Thormann, K.** 2001. Untersuchungen zur Regulation des *sol*-Operons von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.
- Thormann, K., L. Feustel, K. Lorenz, S. Nakotte und P. Dürre.** 2002. Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation. *J. Bacteriol.* **184**: 1966-1973.
- Toth, J., A. A. Ismaiel und J. S. Chen.** 1999. The *ald* gene, encoding a coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase, distinguishes *Clostridium beijerinckii* and two other solvent-producing clostridia from *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4973-4980.
- Ullmann, S., A. Kuhn und P. Dürre.** 1996. DNA topology and gene expression in *Clostridium acetobutylicum*: implications for the regulation of solventogenesis. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1413-1418.
- Ulrich, L. E., E. V. Koonin und I. B. Zhulin.** 2005. One-component systems dominate signal transduction in procaryotes. *Trends Microbiol.* **13**: 52-56.
- Vasconcelos, I., L. Girbal und P. Soucaille.** 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.* **176**:1443-1450.
- Wach, A.** 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruption in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259-265.

- Walter, K. A., G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis.** 1992. Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isoenzyme genes. *J. Bacteriol.* **174**: 7149-7158.
- Wang, J.-Y., und M. Syvanen.** 1992. DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol. Microbiol.* **6**: 1861-1866.
- Weber, K., und M. Osbor.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- Welch, T., und D. H. Bartlett.** 1998. Identification of a regulatory protein required for pressure-responsive gene expression in the deep-sea bacterium *Photobacterium* strain SS9. *Mol. Microbiol.* **27**: 977-985.
- Westerheimer, F. H.** 1969. Acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum*. *Methods Enzymol.* **14**: 231-241.
- Wilkinson, S. R., D. I. Young, J. G. Morris und M. Young.** 1995. Molecular genetics and the initiation of solventogenesis in *Clostridium beijerinckii* (formerly *Clostridium acetobutylicum*) NCIMB 8052. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 257-313.
- Wong, J., und G. N. Bennett.** 1996. The effect of novobiocin on solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *J. Ind. Microbiol.* **16**: 354-359.
- Xie, Z.-D., D. Hershberger, S. Shankar, R. W. Ye und A. M. Chakrabarty.** 1996. Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J. Bacteriol.* **178**: 4990-4996.
- Yang, Y., und R. R. Isberg.** 1997. Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH 6 antigen adhesin by two envelope-associated components. *Mol. Microbiol.* **24**: 499-510.
- Young, M., N. P. Minton und W. L. Staudenbauer.** 1989. Recent advances in the genetics of the clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**: 301-326.
- Young, M., und S. T. Cole.** 1993. *Clostridium*. In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics (A. L. Sonenshein, J. A. Hoch und P. Losick; Hrsg.), ASM Press, Washington, D. C., USA, S. 35-52.

**Youngleson, J. S., D. T. Jones und D. R. Woods.** 1989. Homology between hydroxybutyryl coenzyme A dehydrogenase enzymes from *Clostridium acetobutylicum* fermentation and vertebrate fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway. J. Bacteriol. **171**: 6800-6807.

**Yu, H., M. J. Schurr und V. Deretic.** 1995. Functional equivalence of *Escherichia coli*  $\sigma^E$  and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: *E. coli* *rpoE* restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in *algU* mutants of *P. aeruginosa*. J. Bacteriol. **177**: 3259-3268.

**Yu, P.-L., J. B. Smart und B. M. Ennis.** 1987. Differential induction of  $\beta$ -galactosidase and phospho- $\beta$ -galactosidase activities in the fermentation of whey permeate by *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **26**: 254-257.

**Yu, R. R., und V. J. DiRita.** 1999. Analysis of an autoregulatory loop controlling ToxT, cholera toxin, and toxin-coregulated pilus production in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. **181**: 2584-2592.

**Yu, T. W., und D. A. Hopwood.** 1995. Ectopic expression of the *Streptomyces coelicolor* *whiE* genes for polyketide spore pigment synthesis and their interaction with the *act* genes for actinorhodin biosynthesis. Microbiology **141**: 2779-2791.

# Lebenslauf

23. April. 1976	Geburt in Andernach
1982-1984	Besuch der Grundschule Wielenbach
1984-1987	Besuch der Grundschule und des Gymnasiums in Belgien
1987-1989	Besuch des Gymnasiums Wiblingen
1989-1995	Besuch des Lessing-Gymnasiums Neu-Ulm
1995	Allgemeine Hochschulreife
Oktober 1995	Immatrikulation an der Universität Ulm im Fach Biologie
1997	Diplomvorprüfungen in den Fächern Zoologie, Botanik, Chemie und Physik
1999	Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie (Hauptfach), Cytologie, Neurobiologie und Chemie
Oktober 1999- August 2000	Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm zum Thema: Isolierung und Charakterisierung einer <i>Corynebacterium glutamicum</i> Mutante mit deregulierter Isocitrat-Lyase
Oktober 2000- September 2001	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm
Oktober 2001	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation in der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm

## Danksagung

Prof. Dr. Peter Dürre möchte ich dafür danken, daß er mir das Thema für diese Arbeit überlassen und mir jegliche Freiheiten bei der Bearbeitung und Präsentation gewährt hat. Vor allem danke ich ihm dafür, daß er mir stets den Rücken gestärkt hat, auch, wenn das bedeutete mir nicht nur Hoch-, sondern auch Tiefpunkte zu erleben.

HD Dr. Ulrike Gerischer möchte ich für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit danken und für ein sehr schönes halbes Jahr in ihrer Arbeitsgruppe.

Auch Prof. Dr. Bernhard Eikmanns möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen. Wie auch schon während meiner Diplomarbeit hatte er auch in den Jahren meiner Doktorarbeit immer ein offenes Ohr für fachliche Diskussionen und persönliche Fragen.

Herrn Dr. Steffen Schaffer danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF-Experimente, die den Grundstein für diese Arbeit legten.

Ebenso sei allen Praktikanten gedankt, die an Teilen dieser Arbeit mitgewirkt haben: Simone, Manu, Sonja, Steffi R. und Silvia. Nicht zu vergessen Brigitte Z., ohne deren Hilfe ich der RNA wahrscheinlich nie 'Herr' geworden wäre. Die Zusammenarbeit mit Euch war einfach super!

Meinen (ehemaligen) Kollegen im Labor danke ich für eine wunderschöne Zeit. Insbesondere Brigitte Z., die einfach fehlt, wenn sie mal nicht im Labor ist, Kai und Thorsten, die mir sehr geduldig die grundlegenden Techniken der Molekularbiologie beigebracht haben, Rüdiger, der immer dafür sorgte, daß ich meine unzähligen Kämpfe mit dem Computer (PC!) am Ende doch gewann und Sandra, die es stets geschafft hat mich wieder aufzubauen, wenn mich mal wieder (und das passierte oft!) der Forscherfrust einholte.

Danke auch an alle anderen (ehemaligen) Mitgliedern der Abteilung. Viele von Euch haben es nicht immer leicht für mich gehabt, dennoch habe ich meine Chance bekommen und es sind wunderbare Freundschaften entstanden – danke Heike, Diana und Birgit.

Da sie oft vergessen werden, ein herzliches Danke auch an die 'Kellerkinder' Bettina J. und Iris für schöne und aufmunternde Gespräche.

Immer wieder Ablenkung vom Arbeitsfrust fand ich bei zahlreichen Mädelsabenden, die bis heute Bestand haben und Raum und Zeit für Klatsch und Tratsch, aber auch für gute Ratschläge und nicht zu vergessen, gutes Essen bieten - Danke Mädels!

Ein großer Dank geht an alle meine Freunde, die mittlerweile über die ganze Welt verstreut sind und mich trotzdem nicht vergessen und stets unterstützt haben.

Ein letzter Dank, der mir aber sehr wichtig ist, geht an meine Eltern. Wie sie es geschafft haben weiß ich nicht, aber irgendwie ist es ihnen gelungen den Glauben an ihr Weibi nicht zu verlieren und mich immer wieder aufs Neue aufzufangen und zu unterstützen (auch wenn das nicht immer ohne den ein oder anderen Kampf ablief..., gell Rolfi!) – Danke!

## Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Ulm, im März 2006

---

Bettina Schiel

