

**Molekularbiologische Untersuchungen zur
Regulation der Sporulation in
*Clostridium acetobutylicum***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften

der Universität Ulm

vorgelegt von

Stephanie Würfl

aus Augsburg

Ulm, 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Dürre angefertigt.

Amtierender Präsident: Prof. Dr. K. J. Ebeling

1. Referent: Prof. Dr. P. Dürre

2. Referent: Prof. Dr. B. Eikmanns

Tag der Promotion: 24.09.2008

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen.....	VII
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligodesoxynukleotide.....	11
2.1.1 Bakterienstämme.....	11
2.1.2 Plasmide.....	13
2.1.3 Oligodesoxynukleotide.....	19
2.2 Zellanzucht.....	25
2.2.1 Nährmedien.....	25
2.2.1.1 LB-Medium [Sambrook et al., 2001].....	26
2.2.1.2 TB-Medium (mod.) [Sambrook et al., 2001].....	26
2.2.1.3 2 x YTG-Medium (mod.) [Oultram et al., 1988].....	26
2.2.1.4 CB-Medium (mod.) [O'Brien und Morris, 1971].....	27
2.2.1.5 CGM (ohne Selensalz) [Hartmanis und Gatenbeck, 1984].....	27
2.2.1.6 Phosphatlimitiertes Medium für kontinuierliche Kulturen (PL-Medium; mod.) [Bahl et al., 1982].....	28
2.2.1.7 Phosphatlimitiertes Minimalmedium, MES-gepuffert [Bertram et al., 1990].	29
2.2.1.8 SOB-Medium [Sambrook et al., 2001].....	29
2.2.1.9 SOC-Medium [Dower et al., 1988].....	30
2.2.1.10 Medienzusätze.....	30
2.2.1.11 Induktion der Blau-Weiß-Selektion.....	31
2.2.2 Zellanzucht.....	31
2.2.2.1 Statische Kultur.....	31
2.2.2.2 Kontinuierliche Kultur	32
2.2.2.3 Stammhaltung.....	33

2.2.3	Bestimmung von Wachstumsparametern.....	33
2.2.3.1	Messung der optischen Dichte.....	33
2.2.3.2	Messung des externen pH-Wertes.....	33
2.2.3.3	Gaschromatographische Analyse des Produktspektrums.....	34
2.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	35
2.3.1	Vorbehandlung von Lösungen und Geräten.....	35
2.3.2	Wasser, Puffer und Lösungen.....	35
2.4	Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien.....	36
2.4.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	36
2.4.2	RNase-Behandlung von wässrigen DNA-Lösungen.....	36
2.4.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	37
2.4.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>E. coli</i> mittels „RNeasy™-Mini Kit“.....	38
2.4.5	DNase-Behandlung von wässrigen RNA-Lösungen.....	38
2.4.6	Isolierung von Plasmid-DNA.....	39
2.4.6.1	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
2.4.6.2	Midi-Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	40
2.4.6.3	Plasmid-Minipräparation mittels Säulenchromatographie aus <i>E. coli</i>	42
2.4.6.4	Plasmidpräparation mittels Säulenchromatographie aus <i>C. acetobutylicum</i>	42
2.5	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren.....	42
2.5.1	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	42
2.5.2	Ethanol-fällung.....	43
2.5.3	Isopropanol-fällung.....	44
2.5.4	Lithiumchlorid-fällung.....	44
2.5.5	Dialyse von DNA.....	44
2.5.6	Reinigung von DNA mittels „UltraClean™15 DNA Purification Kit“.....	45
2.5.7	Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen.....	45
2.5.8	Reinigung von DNA mittels Mikrokonzentratssäulen	45
2.5.9	Reinigung radioaktiv markierter DNA mit „MicroSpin™ G-25 Columns“.....	46
2.5.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	46

2.6	Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten.....	47
2.6.1	Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.6.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
2.6.2.1	Elektrophoretische Trennung nicht-radioaktiver Sequenzier- und „primer extension“-Reaktionen.....	49
2.6.2.2	Elektrophoretische Trennung radioaktiver Sequenzier- und „primer extension“-Reaktionen.....	50
2.6.3	Färben von Nukleinsäuren in Gelen.....	51
2.6.4	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	52
2.7	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren.....	52
2.7.1	Restriktionsspaltung von DNA.....	52
2.7.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	53
2.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten	53
2.7.4	TA-Klonierung von PCR-Produkten.....	54
2.8	PCR-Techniken.....	54
2.8.1	Standard-PCR.....	54
2.8.2	Einfügen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR.....	57
2.8.3	SOE-PCR.....	57
2.8.4	RT-PCR.....	58
2.8.5	Nicht-radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA	60
2.8.6	Sequenzieren von Plasmid-DNA mit radioaktiver Markierung.....	61
2.8.7	Sequenzierung von Plasmid-DNA und Sequenzanalysen.....	62
2.9	DNA-Transfer in Bakterien.....	62
2.9.1	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	62
2.9.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	62
2.9.1.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	63
2.9.2	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	63
2.9.2.1	Herstellung elektrokompeter Zellen.....	64
2.9.2.2	Elektroporation von <i>E. coli</i>	64

2.9.3	X-Gal-Färbung zur Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone.....	64
2.9.4	Elektrotransformation von <i>C. acetobutylicum</i>	65
2.9.4.1	Herstellung elektrokompenter <i>C. acetobutylicum</i> -Zellen.....	65
2.9.4.2	Elektroporation von <i>C. acetobutylicum</i>	66
2.9.4.3	Methylierung von Plasmid-DNA für die Transformation in <i>C. acetobutylicum</i>	66
2.10	Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten.....	67
2.10.1	„primer extension“-Analyse.....	67
2.10.1.1	„primer extension“-Analyse mit nicht radioaktiver Markierung am LiCor....	67
2.10.1.2	„primer extension“-Analyse mit radioaktiver Markierung	69
2.10.1.2.1	Radioaktive Markierung von Oligodesoxynukleotiden für eine radioaktive „primer extension“-Analyse.....	69
2.10.1.2.2	„primer extension“-Reaktion mit radioaktiver Markierung	70
2.10.2	„5'-RACE“	71
2.11	„ClosTron® Gene Knockout System“.....	73
2.11.1	Ein-Schritt-SOE-PCR.....	74
2.11.2	Restriktionsspaltung von DNA-Fragment und Vektor pMTL007.....	75
2.11.3	Ligation von DNA-Fragment und Vektor pMTL007.....	75
2.11.4	Transformation von pMTL007 in <i>C. acetobutylicum</i>	76
2.11.5	Induktion der Integration in <i>C. acetobutylicum</i>	76
2.11.6	Kontrolle der Integration mittels PCR.....	77
2.12	Arbeiten mit Proteinen.....	77
2.12.1	Heterologe Überexpression plasmidkodierter Proteine in <i>E. coli</i>	77
2.12.1.1	„QIAexpress pQE vectors“	77
2.12.1.2	pET-Expressionssystem.....	78
2.12.1.3	Überexpression plasmidkodierter Proteine.....	79
2.12.2	Herstellung von Rohextrakten.....	80
2.12.3	Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure.....	81
2.12.4	Konzentrieren und Entsalzen von Proteinlösungen.....	82

2.12.4.1	Dialyse.....	82
2.12.4.2	PD10-Säulen	83
2.12.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach „Pierce“	83
2.12.6	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen.....	84
2.12.7	Größenbestimmung von im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinen.....	87
2.12.8	Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen über Silber-Färbung.....	87
2.12.9	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen („Western blot“)......	89
2.12.10	Detektion rekombinanter „his-tag“-Fusionsproteine mit Antikörpern.....	90
2.12.11	Bestimmung der Luciferase-Aktivität.....	91
2.12.12	Phosphorylierung von Proteinen mit radioaktiver Markierung.....	92
2.13	Internetrecherchen.....	94
2.14	Gase, Chemikalien und Geräte.....	95
3	Experimente und Ergebnisse.....	103
3.1	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von <i>spo0A</i> aus	
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	103
3.1.1	Nicht radioaktive „primer extension“-Experimente.....	105
3.1.2	Radioaktive Durchführung von „primer extension“-Experimenten.....	109
3.1.3	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels „5'-RACE“	116
3.2	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von <i>ptb</i> aus <i>Clostridium acetobutylicum</i> .	117
3.3	Untersuchung der Promoterregion von <i>spo0A</i> mit einem Luciferase-Reportergen-System.....	120
3.4	Identifizierung der für die Phosphorylierung von Spo0A in	
	<i>Clostridium acetobutylicum</i> verantwortlichen Kinase	131
3.4.1	Heterologe Überexpression der von CAC0323, CAC0437, CAC0903 und CAC2730 kodierten Kinasen aus <i>C. acetobutylicum</i> in <i>E. coli</i>	133
3.4.1.1	Verwendung des Überexpressionsvektors pQE-30	133
3.4.1.2	Verwendung des Überexpressionsvektors pQE-80L.....	137
3.4.1.3	Verwendung des Überexpressionsvektors pET-28(a)+.....	140

3.4.2	Phosphorylierung von Spo0A	149
3.4.3	Nachweis der Transkripte von CAC0323, CAC0323_trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903_trunc, CAC2730 und CAC2071 mittels RT-PCR.....	150
3.4.4	Verwendung des „ClosTron® Gene Knockout System“ zur Identifizierung der für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortlichen Kinase.....	154
3.4.5	Heterologe Überexpression von Spo0A aus <i>C. acetobutylicum</i> in <i>E. coli</i>	160
3.4.6	Heterologe Überexpression von Rgg3 aus <i>Streptococcus agalactiae</i> sowie Hpr, HprK/P und CcpA aus <i>C. acetobutylicum</i> in <i>E. coli</i>	163
3.4.6.1	Heterologe Überexpression von Rgg3 aus <i>Streptococcus agalactiae</i> in <i>E. coli</i>	163
3.4.6.2	Heterologe Überexpression von Hpr, HprK/P und CcpA aus <i>C. acetobutylicum</i> in <i>E. coli</i>	165
3.5	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von CAC3156 aus <i>Clostridium acetobutylicum</i>	167
4	Diskussion.....	171
4.1	Einführung zur Sporulation in verschiedenen Organismen	171
4.2	Das Spo0A-Protein – Bindeglied zwischen Lösungsmittelbildung und Sporulation....	173
4.2.1	Der Transkriptionsstart von <i>spo0A</i> in <i>C. acetobutylicum</i>	174
4.2.2	Regulation der <i>spo0A</i> -Transkription durch palindromische Sequenzen im Promoterbereich von <i>spo0A</i>	179
4.3	Aktivierung von Spo0A durch Phosphorylierung.....	185
4.4	Der Transkriptionsstartpunkt von CAC3156 in <i>C. acetobutylicum</i>	193
5.a	Zusammenfassung.....	196
5.b	Summary.....	198
6	Literaturverzeichnis.....	199
7	Anhang.....	221

Abkürzungen

α	Alpha
A	Adenin; Ampere; Aqua
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AdhE	Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase E
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AG	Aktiengesellschaft
AMP	Adenosinmonophosphat
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
β	Beta
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
Bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin; Kohlenstoff
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius

ca.	circa
Cm	Chloramphenicol
CBM	clostridial basal medium
CGM	clostridial growth medium
Ci	Curie
cm	Zentimeter
Co	Kompanie
CoA	Coenzym A
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	counts per minute
d	desoxy-; Schichtdicke
D	dexter (rechts)
Da	Dalton
Del.	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
ε	molarer Extinktionskoeffizient

E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
E ⁰	Normalpotential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Erythromycin
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
γ	Gamma
g	Gramm
* g	* fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GC	Gaschromatograph
G+C	Guanin+Cytosin
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
J	Joule
i. d. R.	in der Regel
Inc.	Incorporated (eingetragen)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRD	infrared-dye

Abkürzungen

k	kilo- (10^3)
K	Kelvin
KBp	Kilobasenpaare
KG	Kommanditgesellschaft
Km	Kanamycin
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i> ; <i>Lactobacillus</i>
LB	Luria-Bertani
log	Logarithmus
μ	Mikro- (10^{-6})
m	Meter, Milli- (10^{-3})
M	molar (mol/l); Mega-
max.	maximal
MES	2-Morpholinopropansulfonsäure
min	Minute(n)
MKS	Multiple Klonierungsstelle
MLS	Macrolid-Lincosamid-Streptogramin B
mod.	modifiziert
mol	Mol ($6,023 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
n	Nano- (10^{-9})
N	Anzahl an; Stickstoff; Normalität
NAD(P) [H]	Nicotinamidadenindinukleotid(-2'-Phosphat) [reduziert]

NPG	Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
Nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotriessigsäure
Ω	Ohm
o	ortho
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF/ <i>orf</i>	open reading frame (offener Leserahmen)
oriR(+)	vegetativer Replikationsursprung Gram-positiver Bakterien
p	Para-; Pico- (10 ⁻¹²); Plasmid
P	Promoter; Phosphat
p. a.	per analysis (zur Analyse)
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PEX	„primer extension“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PIPES	Piperazin-N-N'-bis-[2-Ethan-Sulfonsäure]
PL	Phosphatlimitiert
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pos.	Position
PPi	Pyrophosphat
r	resistent
®	registered (eingetragenes Warenzeichen)

RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
σ	Sigma
s	Sekunde
s	sensitiv
s.	siehe
S.	Seite
SDS	sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOB	super optimal broth
SOC	super optimal broth, catabolite repression
SOE	splicing by overlap extension
sog.	sogenannt
SSC	Natrium-Saline-Citrat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
t	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	terrific broth
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetracyclin

TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TM	trademark (Warenzeichen)
T _m	Schmelztemperatur
Tm	Thiamphenicol
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
t-RNA	transfer-RNA
U	unit (Einheit); Uracil
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
Vers.	Version
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktosid
YTG	yeast tryptone glucose
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit Untersuchungen zur Regulation der Sporulation in *Clostridium acetobutylicum*, wobei der zentrale Transkriptionsregulator Spo0A näher charakterisiert werden sollte. Die Mechanismen, die in lösungsmittelproduzierenden Clostridien die Sporulation regulieren, sind trotz des hohen Interesses an diesem Organismus im Hinblick auf eine biotechnologische und medizinische Nutzung noch weitgehend ungeklärt.

Der Organismus *Clostridium acetobutylicum* zählt zu den strikt anaeroben Bakterien mit einem niedrigen G+C-Gehalt von nur 31 % und gehört der Gram-positiven *Bacillus/Clostridium*-Gruppe an. Durch peritrich angeordnete Geißeln ist das Bakterium gut beweglich. Die vegetativen Zellen sind stäbchenförmig, ihre Gestalt ist jedoch variabel und wird maßgeblich von den Milieubedingungen bestimmt. Unter dem Aspekt der bevorzugten Energiequelle können Clostridien in sog. proteolytische und saccharolytische Vertreter eingeteilt werden. Der ersten der beiden genannten Gruppen gehören eine Vielzahl pathogener Vertreter wie z. B. *C. botulinum*, *C. perfringens* oder *C. tetani* an, während *C. acetobutylicum* zur Gruppe der saccharolytischen Clostridien gerechnet wird und Substrate wie Saccharose, Stärke, Molke [Maddox, 1980], Lignocellulose [Yu et al., 1984] und auch Hemicellulose [Lee et al., 1985; Lemmel et al., 1986] verstoffwechseln kann. Neben der Fähigkeit zur Bildung von Endosporen ist das Auftreten eines zweiphasigen Gärungsstoffwechsels für diesen Organismus charakteristisch. Hierbei werden zuckerhaltige Substrate in dem ersten, mit der logarithmischen Phase einhergehenden, Abschnitt des Stoffwechsels neben Wasserstoff und Kohlendioxid primär zu den Säuren Acetat und Butyrat umgesetzt. Der dadurch niedrige pH-Wert im Medium, aber auch verschiedene andere Faktoren (wie z. B. Überfluß an Glucose bei gleichzeitigem Phosphat- und Schwefelmangel, Menge von Butyrat bzw. Butyryl-Phosphat im Medium, Verhältnis NAD(P)/NAD(P)H, H⁺ und ATP/ADP) führen in der zweiten Phase des Stoffwechsels zum sog. „shift“, wobei bis heute noch keinem der eben genannten Faktoren die Schlüsselrolle des Auslösers zugeordnet werden konnte [Bahl et al., 1982; Bahl und Gottschalk, 1984; Gottschalk und Morris, 1981; Grupe und Gottschalk, 1992; Holt et al., 1984; Hüseman und Papoutsakis, 1986; Jewell et al., 1986; Paredes et al., 2005; Terraciano und Kashket, 1986; Zhao et al., 2005]. Vielmehr scheint eine Kombination aus mehreren Faktoren für die Initiation der Solventogenese verantwortlich zu sein [Dürre et al., 1995; Ullmann et al., 1996]. Da eine zu hohe Konzentration an Butyrat im Medium zu einem Zusammenbruch des Protonengradienten über der Cytoplasmamembran führen würde, werden bei dieser Umstellung des Stoffwechsels von

Säure- auf Lösungsmittelproduktion beim Übergang in die stationäre Phase ein Teil der zuvor gebildeten Säuren und das verbliebene Substrat zu den dominierenden Lösungsmitteln Aceton und Butanol, aber auch zu Ethanol und Acetoin fermentiert [Dürre, 2005; Harris et al., 2002]. Gleichzeitig mit der Lösungsmittelbildung wird die Endosporenbildung initiiert. Hierbei kommt es im Organismus zu einer Reihe von morphologischen und physiologischen Prozessen [Labbe, 2005], wie beispielsweise zur Veränderung der Zellform, Speicherung von Granulose [Reysenbach et al., 1986] und Verlust der Beweglichkeit. Letztendlich führt die Reaktion der Zelle auf die veränderten Wachstumsbedingungen bis zur Sporulation [Jones et al., 1982; Long et al., 1984a; Long et al., 1984b], die das Überleben des Organismus sichert, falls die Butanolkonzentration in der Umgebung über 2 % [Dürre et al., 2002] steigen sollte. Die Lösungsmittelbildung verschafft dem Organismus somit genügend Zeit, die Endosporenbildung einzuleiten, um der drohenden Lösungsmitteltoxizität zu entgehen und damit sein Überleben zu sichern [Dürre et al., 2002].

Die Geschichte der mikrobiellen Produktion von Butanol und Aceton geht auf das Jahr 1861 bzw. 1904 zurück. 1861 wurde erstmals von Pasteur über die Produktion von Butanol durch eine mikrobielle Fermentation berichtet [Pasteur, 1861a; Pasteur, 1861b; Pasteur, 1862]. Durch Schardinger wurde im Jahr 1904 die fermentative Bildung von Aceton bekannt [Schardinger, 1904; Schardinger, 1905]. Diese Eigenschaft der mikrobiellen Produktion von Aceton und Butanol wurde dann am Anfang des 20. Jahrhunderts auf Grund des aufkommenden Mangels an Naturkautschuk für die industrielle Herstellung von synthetischem Kautschuk interessant. Durch Chaim Weizmann, der den meisten Menschen weniger als großer Chemiker, sondern eher als einer der Gründerväter und erster Präsident des Staates Israel bekannt ist, konnte 1915 ein Butanol- und Aceton-bildender Stamm isoliert werden, der von ihm als Stamm BY bezeichnet wurde [Gabriel, 1928]. Später erhielt dieser Stamm den Namen *Clostridium acetobutylicum* [McCoy et al., 1926]. Während des 1. Weltkrieges war die Produktion von Aceton wichtig zur Herstellung von rauchfreiem Schießpulver. Daher ging man zur anaeroben Gärung mit *Clostridium acetobutylicum* über. Butanol fand erst nach dem ersten Weltkrieg als Lösungsmittel für die Autolackherstellung (Nitrocelluloselacke) in größerem Rahmen Verwendung. Bis 1950 wurden die beiden Lösungsmittel Aceton und Butanol großindustriell durch Vergärung von Kartoffeln, Getreide, Mais und Melasse durch verschiedene *C. acetobutylicum*-Stämme hergestellt. Hier ist anzumerken, dass alle zur Produktion dieser Lösungsmittel benutzten Stämme überwiegend als *C. acetobutylicum* bezeichnet wurden. Auf Grund von neuen Erkenntnissen auf molekulargenetischer Grundlage wurde Mitte der 90er Jahre eine korrigierte Spezieszuordnung eingeführt. Heute werden die vier Spezies *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* [Keis et al., 1995; Keis et al.,

2001a; Keis et al., 2001b] unterschieden. Die ABE-(Aceton, Butanol, Ethanol) Fermentation nach Weizmann stellte somit besonders in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts das zweitwichtigste Fermentationsverfahren nach der Ethanolproduktion durch *Saccharomyces cerevisiae* dar [zur Übersicht: Jones und Woods, 1986; Dürre und Bahl, 1996; Dürre, 2005]. Wegen des zunehmenden Konkurrenzdrucks durch petrochemische Verfahren und der Verteuerung des Substrates Melasse sank jedoch ab den 1950er Jahren die Bedeutung der fermentativen Verfahren zur Herstellung von Aceton und Butanol stark. Vereinzelt wurde noch bis in die 1980er in Südafrika und der ehemaligen Sowjetunion und sogar bis 2004 in China produziert [Jones, 2001; Zverlov et al., 2006; Chiao und Sun, 2007]. Verursacht durch die Ölkrise 1973 lässt allerdings das Bewusstsein der Begrenztheit fossiler Brennstoffe die Gewinnung von Industriechemikalien aus regenerativen Quellen wieder zunehmend interessanter werden. Die biotechnologische Herstellung von Biokraftstoffen (z. B. Biobutanol) als direkter Erdölersatz und zur Verringerung der Treibhausgase ist Thema aktueller Diskussionen [Dürre, 2007; Dürre, 2008]. Neben Aceton und Butanol ist das ebenfalls bei der Gärung anfallende Acetoin [Andersch et al., 1982; Bunday et al., 1989] ein nicht zu unterschätzendes Produkt, das in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksstoff eingesetzt wird. So erfuhr in letzter Zeit die Forschung der mikrobiellen Lösungsmittelbiosynthese basierend auf erneuerbaren Ressourcen neuen Aufschwung [zur Übersicht: Dürre, 1998; Dürre, 2007; Dürre, 2008; Dürre und Bahl, 1996; Jones und Woods, 1986; Santangelo und Dürre, 1996]. 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] erleichterte die Forschung auf diesem Gebiet erheblich. Die meisten der an der Lösungsmittelbildung direkt oder indirekt beteiligten Gene liegen separat vom 3,94-MBp-großen Chromosom auf einem 192-kBp-großen Megaplasmid pSOL1 [Cornillot et al., 1997].

Neben der biotechnologischen Lösungsmittelsynthese ist die Nutzung nicht-pathogener Clostridien im Bereich der Medizin von aktuellem Interesse. Hier sollen unter anderem im Rahmen der als CDEPT bezeichneten Antitumor-Therapie [Minton et al., 1995; Minton, 2003] *in vivo* verabreichte *Clostridium*-Sporen, die von gentechnisch veränderten Clostridien produziert wurden, im hypoxischen Gewebe eines Tumors auskeimen und auf diesem Weg gezielt Enzyme zum Tumor bringen. Eine für den Patienten nicht wirksame Vorstufe eines Arzneimittels wird zeitlich versetzt, also erst nach der Besiedelung des Tumors, dem Patienten intravenös injiziert. Diffundieren nun diese Substanzen in das Gewebe des Tumors, werden sie dort durch die von den Clostridien sezernierten Enzymen in die wirksame Form des Arzneimittels überführt. Dessen Wirkung entfaltet sich lediglich in einem sehr begrenzten Umfeld des Tumors, was ein sehr großer Vorteil gegenüber der Chemotherapie ist, die auch

gesundes Gewebe zerstört und zudem meist starke Nebenwirkungen zeigt. Auch vor diesem Hintergrund werden also Untersuchungen zur Genregulation in Clostridien zunehmend interessanter, wobei besonders die Regulation der Sporulation in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist.

Sporulation ist ein Beispiel für Zelldifferenzierung in Bakterien. Bei dem Wechsel von vegetativem Wachstum zur Bildung einer Endospore müssen eine Vielzahl genetisch regulierter Veränderungen mit morphologischen Veränderungen der Zelle räumlich und zeitlich koordiniert werden, wozu auch die Durchführung eines komplexen Programms der Genexpression in verschiedenen Zelltypen (Mutterzelle und Vorspore) gehört. Viele *Bacillus*- und *Clostridium*-Arten bilden als Stressantwort auf sich ändernde Umweltbedingungen hitze-, chemikalien- und strahlungsresistente Endosporen aus [Driks, 1999], um lange Perioden - allerdings unter Aufgabe der ökologischen Nische und Ausscheiden aus evolutiven Prozessen - überdauern zu können. Auf Grund dessen kommt die Sporenbildung in der Reaktion auf überlebensgefährdende Umweltbedingungen nur als letzter Ausweg in Betracht. Die Erforschung der Sporulation wurde bisher mit vielen strukturellen und molekularbiologischen Untersuchungen am vollständig sequenzierten Modellorganismus *B. subtilis* [Kunst et al., 1997] durchgeführt.

Die Entwicklung einer vegetativen *B. subtilis*-Zelle zu einer Endospore wird hinsichtlich der morphologischen Veränderungen in sieben Stadien eingeteilt und benötigt bei 37 °C etwa 7 Stunden. Nach einer Verdichtung von zwei identischen Chromosomensätzen entlang der Längsachse der vegetativen Zelle (Stadium I) kommt es zu der Bildung eines asymmetrischen Septums (Stadium II). Das Resultat sind zwei unterschiedlich große Kompartimente, die größere Mutterzelle und die kleinere Vorspore, wobei beide ein identisches Genom beinhalten. Nachdem die Mutterzelle die Vorspore umhüllt hat (Stadium III), ist diese von zwei Membranen umschlossen, die im weiteren Verlauf der Sporulation zu mehreren dicken, proteinreichen und aus locker quervernetztem Peptidoglycan bestehenden Cortexschichten (Stadium IV) und einer äußeren Sporenhülle (Stadium V) erweitert werden. Damit einhergehend findet eine Dehydrierung der Vorspore statt. Nach der sog. Reifung (Stadium VI), erfolgt die Freisetzung der Spore durch Lyse der Mutterzelle (Stadium VII). Unter besseren Bedingungen kann die Spore wieder auskeimen und sich erneut vegetativ vermehren [zur Übersicht: Hilbert und Piggot, 2004; Labbe, 2005].

Hinsichtlich der morphologischen Veränderungen während der Ausbildung der Endospore gibt es bei Clostridien einige Unterschiede zu *B. subtilis*. Viele Clostridien-Sporen tragen zusätzliche Anhängsel, die von dem Sporen-„coat“ (äußere Sporenhülle) stammen. Außerdem

durchlaufen Clostridien vor der Sporulation eine zusätzliche Zelldifferenzierung. Die Zellen schwellen an und zeigen unter dem Mikroskop lichtbrechende Eigenschaften. Die für sporulierende Clostridien typische zigarrenähnliche Form ist zu beobachten [Woods und Jones, 1986]. Während dieses Stadiums schließen die Zellen das Polyglucan Granulose ein, das später bei der Sporulation wieder abgebaut wird und so als Kohlenstoff- und Energiequelle dient [Reysenbach et al., 1986].

Auf genetischer Ebene stellt die Sporulationskaskade in *B. subtilis* den wohl komplexesten und eindrucksvollsten Regulationsmechanismus der Genexpression über alternative Sigma-Faktoren bei Prokaryoten dar. Die Regulation der sog. *spo*-Gene durch Aktivierung einer zeitlich und räumlich kontrollierten Kaskade von RNA-Polymerase-Sigma-Faktoren ist in diesem Organismus am besten untersucht. Für die unterschiedliche Entwicklung der beiden Kompartimente sorgt eine differentielle Genexpression, die durch die kompartimentspezifischen Sigma-Faktoren erreicht wird. In einer festgelegten Reihenfolge treten verschiedene dieser Faktoren abwechselnd in Sporenmutter- und sporulierender Zelle in Aktion und führen unter Zuhilfenahme des Sigma-Faktors σ^H und des globalen Sporulationsregulators Spo0A~P zur Expression von Genen, deren Produkte bei der Sporenbildung benötigt werden [Hilbert und Piggot, 2004; Losick und Stragier, 1992; Piggot und Losick, 2002; Stragier und Losick, 1996; Stragier und Losick, 1990]. In der Vorspore sind nacheinander der Sigma-Faktor σ^F und der Sigma-Faktor σ^G aktiv, die von Anti-Sigma-Faktoren und Anti-Anti-Sigma-Faktoren reguliert werden. Die Genexpression in der Mutterzelle wird durch den Sigma-Faktor σ^E und danach durch den Sigma-Faktor σ^K reguliert, die beide, als Vorstufen gebildet, erst durch Proteolyse in die aktive Form überführt werden. Die Aktivierung der Sigma-Faktoren in den beiden Kompartimenten beruht auf einer Kommunikation zwischen Vorspore und Sporenmutterzelle, die auch „criss-cross“-Regulation genannt wird [Burkholder und Grossman, 2000; Hilbert und Piggot, 2004; Losick und Stragier, 1992; Piggot und Losick, 2002]. Aber auch eine Vielzahl anderer sporulationsspezifischer Gene wird auf genetischer Ebene durch ein komplexes An- und Abschalten reguliert. In Abbildung 1 ist der komplizierte Vorgang der Regulation der Sporulation in *B. subtilis* anhand der für die Sporulation wichtigsten Gene und Faktoren bis Stadium V gezeigt.

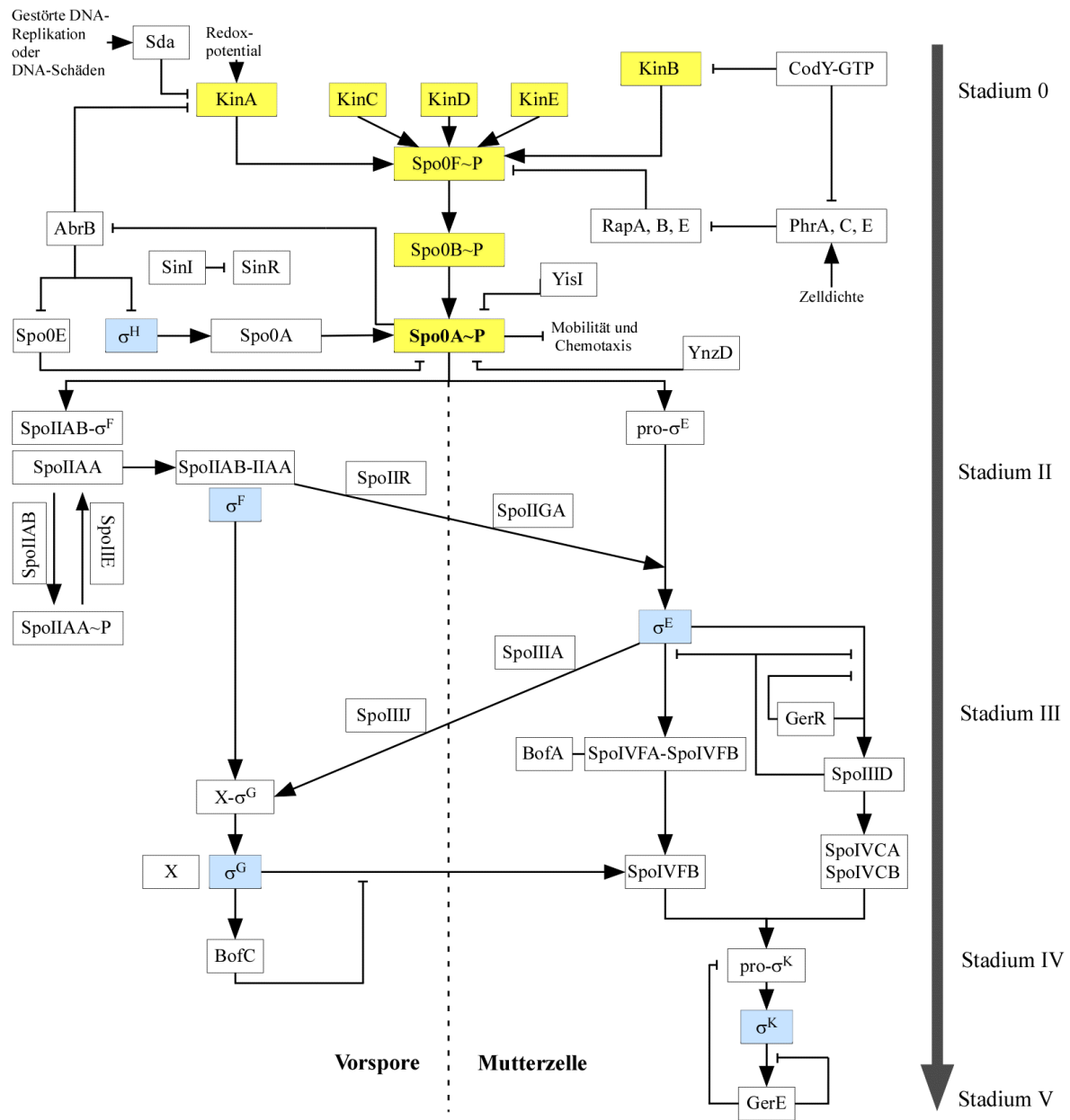


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Regulation der Sporulation in *Bacillus subtilis*. Dargestellt sind die wichtigsten Faktoren und Gene, die bei der Regulation der Sporulation in der *B. subtilis*-Endosporenbildung bis zum Stadium V eine Rolle spielen. Rechts ist mit einem Pfeil jeweils das entsprechende Stadium der Endosporenbildung angezeigt. Farblich hervorgehoben sind die Komponenten des „phosphorelay“ (gelb), der zur Phosphorylierung von Spo0A führt, und neben σ^H die „criss-cross“-Regulation der kompartimentspezifischen Sigma-Faktoren (σ^F , σ^E , σ^G , σ^K ; hellblau), die letztendlich zur Ausbildung einer Endospore und deren Freilassung durch Lyse der Mutterzelle führt. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen [zur Übersicht: Hilbert und Piggot, 2004 und Paredes et al., 2005].

Bei der Initiation der Sporulation spielen in *B. subtilis* die Transkriptionsfaktoren Spo0A und AbrB eine zentrale Rolle [Brown et al., 1994; Phillips und Strauch, 2002].

Das Protein Spo0A ist der zentrale Transkriptionsregulator für die Initiation der Sporulation. Diese ist in *Bacillus subtilis* abhängig von der Menge an phosphoryliertem und dadurch aktiviertem Spo0A. Spo0A gehört zur Familie der „response regulator“-Proteine und ist Teil eines Zwei-Komponenten-Systems, das allerdings komplexer aufgebaut ist als das klassische Zwei-Komponenten-System [Burbulys et al., 1991]. Eine Komponente stellt dabei eine Histidin-Kinase dar, die nach Autophosphorylierung eines konservierten Histidin-Restes in der regulatorischen Domäne als Substrat für einen Phosphattransfer zu einem weiteren „response regulator“ dient [Albright et al., 1989; Bourret et al., 1991]. Im Zuge des sog. „phosphorelay“, der in Abbildung 2 dargestellt ist, wird in *Bacillus subtilis* Spo0A dabei aber nicht direkt phosphoryliert, stattdessen handelt es sich um eine verzweigte Kaskade von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Sensoren und „response regulator“-Proteinen [Spiegelman et al., 1995]. In Folge von noch unidentifizierten Stimuli werden die Histidin-Kinasen KinA und KinB, die für die Initiation der Sporulation wichtigsten Kinasen, und die Kinasen KinC, KinD und KinE an einem konservierten Histidin-Rest autophosphoryliert. Die Phosphatgruppen werden dann auf den „response regulator“ Spo0F übertragen, der allerdings keine „output“-Domäne enthält und somit auch nicht als Transkriptionsfaktor agieren kann. Er existiert lediglich als eine Art intermediäre Komponente des „phosphorelay“. Die Phosphotransferase Spo0B überträgt letztendlich das Phosphat von Spo0F~P auf einen konservierten Aspartat-Rest von Spo0A [Burbulys et al., 1991]. Die Phosphorylierung der regulatorischen Domäne (Akzeptor; N-Terminus) von Spo0A aktiviert dann die transkriptionsaktivierende oder transkriptionsreprimierende Eigenschaft seiner Effektor-Domäne (C-Terminus) [Stephenson und Hoch, 2002].

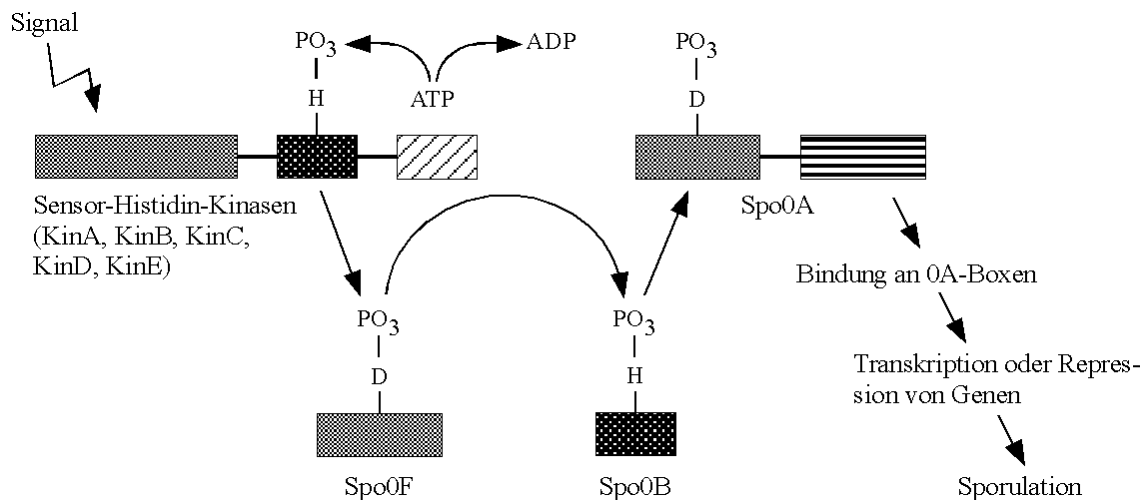


Abbildung 2: Aktivierung von Spo0A im „phosphorelay“ von *B. subtilis*. Aufgrund eines bisher unbekannten Signals kommt es zu einer Autophosphorylierung von KinA (bzw. KinB, KinC, KinD und KinE) an einem konservierten Histidin-Rest (H). Über Spo0F und Spo0B wird Phosphat auf Spo0A übertragen. Durch die Phosphorylierung des Aspartat-Rests (D) in der Akzeptor-Domäne von Spo0A kommt es zu einer Konformationsänderung und die Effektor-Domäne liegt frei, um an Promotoren mit einer 0A-Box zu binden. Spo0A kann in phosphorylierter, aktiver Form als Transkriptionsaktivator oder Transkriptionsrepressor agieren. Ähnliche Domänen sind durch ähnliche Schraffierungen angezeigt.

Trotz vieler Ähnlichkeiten im Sporulationsprozess bei Bacilli und Clostridia war es äußerst verwunderlich, als Genomsequenzierungen ergaben, dass in *C. acetobutylicum* [Nölling et al., 2001; Stragier, 2002; Dürre und Hollergschwandner, 2004], *C. perfringens* [Shimizu et al., 2002] und *C. tetani* [Brüggemann und Gottschalk, 2004], aber auch in allen anderen bis hierhin sequenzierten Clostridia die „phosphorelay“-Komponenten Spo0F und Spo0B nicht existieren. Es wurden weder homologe Gene zu diesen beiden Komponenten, noch potentielle Kandidaten mit einer signifikanten Ähnlichkeit zu den verschiedenen Signal-übertragenden Kinasen aus *B. subtilis* gefunden. Auch homologe Gene zu den Rap- („response regulator aspartyl phosphatase“) Proteinen RapA, RapB und RapE, die normalerweise bei geringer Zelldichte die „phosphorelay“-Komponente Spo0F~P dephosphorylieren und so die Aktivierung von Spo0A verhindern, fehlen. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Initiation der Sporulation in Clostridien andere Signale benötigt als in Bacilli [Dürre und Hollergschwandner, 2004; Paredes et al., 2005; Stephenson und Hoch, 2002; Stephenson und Lewis, 2005]. Das könnte durch die unterschiedlichen, äußeren Bedingungen erklärt werden, die bei diesen beiden Gattungen zur Auslösung des Sporulationsprozesses führen. Im

Gegensatz zu Bacilli, in welchen die Sporulation eine Antwort auf Nährstoffmangel ist, sporulieren Clostridia, um den lebensfeindlichen Bedingungen in Folge der Produktion von organischen Säuren, dem darauffolgendem Absinken des internen und externen pH-Wertes und dem folglich drohenden Zusammenbruch des Protonen-Gradienten über der Cytoplasmamembran zu entkommen [Dürre et al., 2002]. Es scheint am wahrscheinlichsten, dass Spo0A in Clostridien über ein mehr oder weniger klassisches Zwei-Komponenten-System, also direkt von einer bzw. mehreren Histidin-Kinasen phosphoryliert wird [Paredes et al., 2005; Stephenson und Hoch, 2002; Stragier, 2002]. Dieser Frage sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter anderem nachgegangen werden. Mit Hilfe der Überexpression potentieller Kinasekandidaten mit anschließenden *in vitro* Phosphorylierungsversuchen und mit Hilfe eines speziell für Clostridien entwickelten Systems zum spezifischen, dauerhaften Ausschalten von Genen („ClosTron® Gene Knockout System“) sollte die Identifizierung der Kinase(n) erfolgen, die für die Phosphorylierung von Spo0A in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 verantwortlich ist bzw. sind.

Phosphoryliertes Spo0A agiert sowohl als Transkriptionsaktivator als auch als -repressor [Satola et al., 1991], indem es an sog. OA-Boxen (7 Bp lang; Sequenz: TGNCGAA) an die DNA bindet [Strauch et al., 1990]. OA-Boxen sind meist in oder nahe bei Promotoren zu finden, die von einer σ^A - oder σ^H -abhängigen RNA-Polymerase erkannt werden. Positiven Einfluss hat Spo0A~P beispielsweise auf seine eigene Expression, indem es einerseits Einfluss bei der Reprimierung seines vegetativen σ^A -Promoters ausübt, auf der anderen Seite aber auch die Induktion seines σ^H -abhängigen Sporulationspromoters bewirkt [Strauch et al., 1992; Strauch et al., 1993]. Hierbei geschieht die Aktivierung des alternativen Sigma-Faktors σ^H indirekt über die Inhibierung der Transkription von *abrB*. AbrB ist ein negativer Regulator der Transkription verschiedener Promotoren [Strauch et al., 1989; Zuber und Losick, 1987]. Dieser verhindert während des exponentiellen Wachstums die Expression von Genen, die gewöhnlich erst in der stationären Phase oder der frühen Phase der Sporulation transkribiert werden sollen. Spo0A~P kann aber auch Promotoren direkt aktivieren. Beispiele hierfür wären die Induktion der Transkription der *spoIIA*- [Trach et al., 1991; Wu et al., 1991] und *spoIIG*- [Satola et al., 1991; Satola et al., 1992] Operone, die unter anderem den Vorsporen-spezifischen Transkriptionsfaktor σ^F und die Vorstufe des Mutterzell-spezifischen Transkriptionsfaktors pro- σ^E kodieren.

Obwohl viele sporulationsspezifische Gene aus *B. subtilis* auch in *C. acetobutylicum* vorhanden sind [Sauer und Dürre, 1995; Wong und Bennet, 1996], gibt es zwischen diesen beiden Arten auch Unterschiede in der Regulation der Sporulation [Dürre et al., 2002; Dürre

und Hollergschwandner, 2004; Hollergschwandner, 2003]. Diese Unterschiede betreffen die auslösenden Signale wie auch die jeweils daran beteiligten Gene [Sauer et al., 1995].

Das Gen für den zentralen Regulator der Sporulation, *spo0A*, wurde in beiden erwähnten Gattungen, *Bacillus* und *Clostridium*, nachgewiesen. Die transkriptionelle Regulation der Expression von *spo0A* in *C. acetobutylicum* galt es, in der vorliegenden Arbeit näher zu untersuchen.

Da in *Bacillus subtilis* im Bezug auf die Transkription von *spo0A* von einem Spo0A~P-vermittelten Promoter-„switching“, d. h. von einem Wechsel von einem σ^A - zu einem σ^H -abhängigen Promoter am Beginn der stationären Phase die Rede ist [Chibazakura et al., 1991] und in *C. acetobutylicum* die Existenz der sporulationsspezifischen Gene für die RNA-Polymerase-Sigma-Faktoren σ^A und σ^H [Nölling et al., 2001; Santangelo et al., 1998; Sauer et al., 1995] eventuell einen ähnlichen Regulationsmechanismus vermuten lässt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Transkriptionsstartpunkt von *spo0A* mittels „primer extension“-Experimente bestimmt. Dadurch sollten bereits erhaltene Startpunkte von *spo0A* aus einer vorangegangenen Arbeit von Concha Hollergschwandner [Hollergschwandner, 2003] verifiziert und eine Aussage über mögliche Gemeinsamkeiten in der Regulation der *spo0A*-Transkription in *B. subtilis* und *C. acetobutylicum* getroffen werden.

Der Promoterbereich von *spo0A* in *C. acetobutylicum* weist zudem zwei interessante palindromische Sequenzen auf, die in der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen könnten. Eine davon wurde im Rahmen dieser Arbeit gezielt mutiert. Mögliche Auswirkungen auf die Transkription von *spo0A* sollten in einem Luciferase-Reportersystem untersucht und die erhaltenen Daten anschließend mit Ergebnissen aus einer vorangegangenen Arbeit von Concha Hollergschwandner verglichen werden, die bereits das andere der beiden Palindrome untersuchte und eine Beteiligung in der Regulation der Transkription von *spo0A* zeigen konnte [Hollergschwandner, 2003].

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

2.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp ¹	Referenz/Herkunft
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792	Typstamm	DSMZ ² , Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F' <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Novagen R&D Systems, Wiesbaden
<i>Escherichia coli</i> BL21 Rosetta2 (DE3)	F' <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cm ^r)	Novagen R&D Systems, Wiesbaden
<i>Escherichia coli</i> ER 2275	<i>trp-31</i> , <i>his-1</i> , <i>tonA2</i> , <i>rpsL104</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>metB1</i> , E14 ⁻ , $\Delta(lac)U169$, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , R(zbgZ10::Tn10)Tc ^s , $\Delta(mcr-hsd-mrr)114::1510$, [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZΔM15, zzd::mini, Tn10(Km ^r)]	Prof. Dr. E. T. Papoutsakis, Northwestern University, Evanston, USA

1: Für die Genotypbezeichnungen siehe Berlyn et al. (1996)

2: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i> SURE™	E14 ⁻ (McrA ⁻), Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>), 171, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>sbcC</i> , <i>umuC::Tn5</i> (Km ^r), <i>uvrC</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene GmbH, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene GmbH, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene GmbH, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^r) <i>amy</i> , Cm ^r]	Stratagene GmbH, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> M15 (pREP4)	<i>nal^s</i> , <i>str^s</i> , <i>rif^s</i> , <i>thi-</i> , <i>lac-</i> , <i>ara</i> , <i>gal</i> , <i>mtl-</i> , <i>F-</i> , <i>recA</i> , <i>uvr</i> , <i>lon</i> Plasmid pREP4	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten sowie neu hergestellten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete bzw. neu konstruierte Plasmide.

Plasmid/Vektor	Größe [kBp]	Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
pUC18	2,7	Ap ^r , <i>lacPOZ</i> , <i>ori</i> MB1	Vieira und Messing, 1982
pIMP1	4,7	Em ^r , Ap ^r , pMB1 <i>oriR</i> , <i>ori</i> (+) pIM13	Mermelstein et al., 1992
pANS1	6,2	Sp ^r , Methyltransferase 3 ϕ T des Phagen ϕ 3T1 in pACYC184	Böhringer, 2002
pDRIVE [®]	3,9	Km ^r , Ap ^r , <i>ori</i> fl, <i>ori</i> pUC, <i>lacZ</i>	Qiagen GmbH, Hilden
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	3,9	Km ^r , Ap ^r , <i>ori</i> fl, <i>ori</i> pUC, <i>lacZ</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pREP4	3,7	Km ^r , <i>lacI</i>	Qiagen GmbH, Hilden
pBRluc		<i>lucB</i> -tragendes Plasmid	Damian Lynch, 2002
pLucBF	6,3	Em ^r , Ap ^r , promoterloses <i>lucB</i> -Gen (ohne Startokodon) über <i>SalI/PstI</i> in pIMP1	Feustel, 2004
pLucBF_neu	6,3	Em ^r , Ap ^r , promoterloses <i>lucB</i> -Gen (ohne Startkodon) über <i>SalI/PstI</i> in pIMP1	diese Arbeit
pLucBF_ptb	6,8	Em ^r , Ap ^r , pLucBF mit 500-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I-Fragment des intergenen Bereichs des <i>ptb-buk</i> -Promoters	Feustel et al., 2004
pQE-30	3,4	<i>ori</i> ColE1, Ap ^r , T5-Promoter; für N-terminale 6xHis-Fusion	Qiagen GmbH, Hilden

Plasmid/Vektor	Größe [kBp]	Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
pQE-80L	4,7	<i>ori</i> ColE1, Ap ^r , T5-Promoter, <i>lacI</i> , für N-terminale 6xHis-Fusion	Qiagen GmbH, Hilden
pET-28a(+)	5,4	<i>oriR</i> pBR322, <i>ori</i> f1, Km ^r , T7-Promoter, <i>lacI</i> , für N- bzw. C-terminale 6xHis-Fusionen	Novagen R&D Systems, Wiesbaden
pMTL007	11,5	<i>ori</i> ColE1, <i>ori</i> T, <i>lacI</i> , Cm ^r , LtrA, für die spezifische Inaktivierung clostridieller Gene mit Hilfe von Gruppe-II-Introns	Prof. Dr. N. P. Minton, Universität Nottingham
pUC18-2071	3,3	Promoterbereich von <i>spo0A</i> (NP_348690 ³) aus <i>C. acetobutylicum</i> als 608-Bp- <i>SalI</i> / <i>SalI</i> -Fragment in pUC18	diese Arbeit
pDrive_3156	4,9	Gen NP_349753 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> und zugehöriger Promoterbereich als 1114-Bp-Fragment in pDRIVE®	diese Arbeit
pDrive_ <i>lucB</i>	5,5	Km ^r , Ap ^r , <i>lucB</i> (1650 Bp; ohne Promoterregion und Startkodon) mit Schnittstellen für <i>SalI</i> und <i>PstI</i> in pDRIVE®	diese Arbeit
pDrive_F1+2wt-neu	4,3	Km ^r , Ap ^r , intergener Bereich von <i>spo0A</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> (nicht mutiert) als 421-Bp- <i>BamHI</i> / <i>SalI</i> -Fragment in pDRIVE®	diese Arbeit
pDrive_F1+2mut-neu	4,3	Km ^r , Ap ^r , intergener Bereich von <i>spo0A</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> (Palindrom 2 mutiert) als 421-Bp- <i>BamHI</i> / <i>SalI</i> -Fragment in pDRIVE®	diese Arbeit
plucBF_neu + F1+2wt-neu	6,7	Em ^r , Ap ^r , intergener Bereich von <i>spo0A</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> (nicht mutiert) als 421-Bp- <i>BamHI</i> / <i>SalI</i> -Fragment in pLucBF_neu	diese Arbeit
plucBF_neu + F1+2mut-neu	6,7	Em ^r , Ap ^r , intergener Bereich von <i>spo0A</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> (Palindrom 2 mutiert) als 421-Bp- <i>BamHI</i> / <i>SalI</i> -Fragment in pLucBF_neu	diese Arbeit

3: Akzessionsnummer

Plasmid/Vektor	Größe [kBp]	Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
pQE30_CAC0323	5,4	Ap ^r , Gen NP_346964 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Start- und Stoppkodon) als 1960-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-30, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE30_CAC0323-trunc	4,7	Ap ^r , um 701 Bp N-terminal-verkürztes Gen NP_346964 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Stoppkodon) als 1255-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-30, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE30_CAC0437	5,3	Ap ^r , Gen NP_347077 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Start- und Stoppkodon) als 1906-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-30, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE30_CAC0903	5,5	Ap ^r , Gen NP_347539 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Start- und Stoppkodon) als 2044-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-30, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE30_CAC0903-trunc	4,8	Ap ^r , um 656 Bp N-terminal-verkürztes Gen NP_347539 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Stoppkodon) als 1384-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-30, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE30_CAC2730	4,3	Ap ^r , Gen NP_349336 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Start- und Stoppkodon) als 904-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-30, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE80L_CAC0323	6,7	Ap ^r , Gen NP_346964 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Start- und Stoppkodon) als 1960-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-80L, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit

Plasmid/Vektor	Größe [kBp]	Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Her- kunft
pQE80L_CAC0323 -trunc	6	Ap ^r , um 701 Bp N-terminal-verkürztes Gen NP_346964 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Stoppkodon) als 1255-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-80L, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE80L_CAC0437	6,6	Ap ^r , Gen NP_347077 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Start- und Stoppkodon) als 1906-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-80L, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE80L_CAC0903	6,8	Ap ^r , Gen NP_347539 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Start- und Stoppkodon) als 2044-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-80L, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE80L_CAC0903 -trunc	6,1	Ap ^r , um 656 Bp N-terminal-verkürztes Gen NP_347539 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Stoppkodon) als 1384-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-80L, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pQE80L_CAC2730	5,6	Ap ^r , Gen NP_349336 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Start- und Stoppkodon) als 904-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment in pQE-80L, N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pET28a_CAC0323	7,3	Km ^r , Gen NP_346964 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Startkodon) als 1961-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II-Fragment in pET-28a(+), N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pET28a_CAC0323 -trunc	6,6	Km ^r , um 701 Bp N-terminal-verkürztes Gen NP_346964 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> als 1256-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II-Fragment in pET-28a(+), N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit

Plasmid/Vektor	Größe [kBp]	Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
pET28a_CAC0437	7,3	Km ^r , Gen NP_347077 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Startkodon) als 1910-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I-Fragment in pET-28a(+), N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pET28a_CAC0903	7,4	Km ^r , Gen NP_347539 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Startkodon) als 2048-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I-Fragment in pET-28a(+), N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pET28a_CAC0903-trunc	6,7	Km ^r , um 656 Bp N-terminal-verkürztes Gen NP_347539 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> als 1388-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I-Fragment in pET-28a(+), N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pET28a_CAC2730	6,3	Km ^r , Gen NP_349336 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> (ohne Startkodon) als 908-Bp- <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I-Fragment in pET-28a(+), N-terminale 6xHis-Fusion	diese Arbeit
pSOA	6,2	Ap ^r , <i>spo0A</i> (NP_348690 ³) aus <i>C. acetobutylicum</i> mit C-terminaler 6xHis-Fusion in pET31(+)	Hollergschwandner, 2003
pET29_hpr	5,5	Km ^r , <i>ptsH</i> (NP_348445 ³) aus <i>C. acetobutylicum</i> mit C-terminaler 6xHis-Fusion in pET-29a(+)	Niklas Nold
pQE_hprK	4,3	Ap ^r , <i>hprK/P</i> (NP_347723 ³) aus <i>C. acetobutylicum</i> mit N-terminaler 6xHis-Fusion in pQE-30	Niklas Nold
pET29_codY	6	Km ^r , <i>codY</i> (NP_348411 ³) aus <i>C. acetobutylicum</i> mit C-terminaler 6xHis-Fusion in pET-29a(+)	Niklas Nold
pET29_ccpA	6,2	Km ^r , <i>ccpA</i> (NP_349637 ³) aus <i>C. acetobutylicum</i> mit C-terminaler 6xHis-Fusion in pET-29a(+)	Niklas Nold

Plasmid/Vektor	Größe [kBp]	Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
pET28a_Rgg3	6,1	Km ^r , putativer Transkriptionsregulator Rgg3 aus <i>Streptococcus agalactiae</i> über <i>NcoI/XhoI</i> in pET-28a(+), C-terminale 6xHis-Fusion	Schaller, 2007
pMTL_CAC3319-257	11,8	Cm ^r , 350-Bp-Integron über <i>HindIII/BsrGI</i> in pMTL007, spezifisch für die Insertion in das Gen NP_349911 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> zwischen Position 257 und 258	diese Arbeit
pMTL_CAC0903-1369	11,8	Cm ^r , 350-Bp-Integron über <i>HindIII/BsrGI</i> in pMTL007, spezifisch für die Insertion in das Gen NP_347539 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> zwischen Position 31 und 32	diese Arbeit
pMTL_CAC0903-1568	11,8	Cm ^r , 350-Bp-Integron über <i>HindIII/BsrGI</i> in pMTL007, spezifisch für die Insertion in das Gen NP_347539 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> zwischen Position 230 und 231	diese Arbeit
pMTL_CAC0323-1086	11,8	Cm ^r , 350-Bp-Integron über <i>HindIII/BsrGI</i> in pMTL007, spezifisch für die Insertion in das Gen NP_346964 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> zwischen Position 186 und 187	diese Arbeit
pMTL_CAC0323-1320	11,8	Cm ^r , 350-Bp-Integron über <i>HindIII/BsrGI</i> in pMTL007, spezifisch für die Insertion in das Gen NP_346964 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> zwischen Position 420 und 421	diese Arbeit
pMTL_CAC0437-1851	11,8	Cm ^r , 350-Bp-Integron über <i>HindIII/BsrGI</i> in pMTL007, spezifisch für die Insertion in das Gen NP_347077 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> zwischen Position 51 und 52	diese Arbeit
pMTL_CAC0437-2046	11,8	Cm ^r , 350-Bp-Integron über <i>HindIII/BsrGI</i> in pMTL007, spezifisch für die Insertion in das Gen NP_347077 ³ aus <i>C. acetobutylicum</i> zwischen Position 246 und 247	diese Arbeit

2.1.3 Oligodesoxynukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide (im weiteren kurz als Oligonukleotide oder „primer“ bezeichnet) sind in Tabelle 3 aufgelistet. Sämtliche Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech AG, Ebersberg und Biomers.net GmbH, Ulm bezogen. Teilweise trugen die Oligonukleotide an ihrem 5'-Ende ein IRD800-Farbstoffmolekül (s. 2.10.1.1). In Tabelle 3 sind zudem Name, Sequenz und errechneter Schmelzpunkt (T_m) angegeben. Außerdem sind bei einigen Oligonukleotiden eingefügte Schnittstellen (in der jeweiligen Sequenz **fett** gekennzeichnet) sowie das dazugehörige Restriktionsenzym aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Oligodesoxynukleotide.

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	T_m [°C]	Restr.- enzym/ Modifikation
1	2071_fw-SalI	GAGTCGAC GGAATGAGTGGAAGTCC	61	<i>SalI</i>
2	2071_rev-SalI	GAGTCGAC GCTATTCCAACAACCTAT C	58	<i>SalI</i>
3	cac2071-ird-pe	CAACAACCTATCATATCGCTTTGG	57	IRD800
4	2071-IRD-PE-2	TAAGAATATTACAAAATTCC	45	IRD800
5	Primex0A-ird-pe	GCTTTAAAGCTTCCACTCCATCCTTT GC	65	IRD800
6	2071-start-1	CAACAACCTATCATATCGCTTTGG	51	-
7	2071-start-2	TAAGAATATTACAAAATTCC	36	-
8	2071-2-neu	TTAAGCAAGTAATCATTAAGAATATT ACAAAATTCC	58	-
9	2071-start-5	GTTAAGCAAGTAATCATTAAG	39	-
10	2071-start-6	TTATTATCATCTGCAATTAA	38	-
11	2071-7-neu	ATTCCAACAACCTATCATATCGCTTTG GTTAAGCAAG	66	-
12	Primex0A	GCTTTAAAGCTTCCACTCCATCCTTT GC	63	-

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Restr.- enzym/ Modifikation
13	cDNArev1	CAATTGTACCTGCAAAGCTTGCCTCT TTCTCTTC	68	-
14	cDNArev2	CTGCTCTGAATTTGATATAGTATTAT TAAACATTTC	57	-
15	cDNArev3	CTCTTATTCTATTAGTGAATACATCC ATATC	51	-
16	ptb-start-neu	CGTCTTGTGCTACAGCAACAG	54	-
17	P3156-start	CGCTGTACTGCTCTTGTCTTTG	52	-
18	3156-PCRfw	AATTTATCTTCACCCTTTG	41	-
19	3156-PCRrev	ATAGTCTATATGGGATACTTTG	40	-
20	cDNA3156-fw3	CTTACCTCTTCTTCATTAACTCGTCA TAAATTTC	59	
21	pLucBF_fw	ACGTAG T CGACGAAGACGCCAAAAA C	72	<i>SalI</i> ; Feustel et al., 2004
22	pLucBF_rev	ACCTGT C TGCAGTTACAATTTGGACT TTCC	71	<i>PstI</i> ; Feustel et al., 2004
23	pLuc-BamHI	TTTATATTGAAT G GATCCTTAAAAGT GCAG	58	<i>Bam</i> HI
24	P2.2_R	AAATTTTACCAT A GAT G CGCAGT G T GTATATTTTA	61	4
25	P2.2_F	TAAAATATACAC A CT G CGCAT C TAT GGTAAAATTT	61	4
26	pLuc-SalI	GCAATTAAAACAC G T C GACTTCTAC TTTCC	69	<i>SalI</i>
27	pLucBF_up	C T G CAGTTACAATTTGGACTTTCC	65	<i>PstI</i>
28	pIMP1_up	CAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGC	70	-
29	pLuc-SalI-neu1	CTTATTTTTTCT G T C GACCATTTTTAA CTCCCC	63	<i>SalI</i>
30	pLucBF-seq-1fw	GGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG	61	-

4: Die Sequenz von Palindrom 2 ist unterstrichen, die darin **fett** markierten Basen zeigen die einzelnen Basenaustausche an

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Restr.- enzym/ Modifikation
31	pLucBF-seq-2fw	CGTTCGTCACATCTCATCTACCTCC	58	-
32	pLucBF-seq-3rev	GACCTCCCAATAACACCACGTAG	54	-
33	Sequ-Insert-fw	GCGGGCCTCTTCGCTATTAC	55	-
34	Sequ-lucB-fw	AGAGGATGGAACCGCTGGAG	55	-
35	P0323-Bam_fw	GAGAGGGATTGGATCCGATTATTCT AAAATAGAG	63	<i>Bam</i> HI
36	P0323-trunc- Bam_fw	ATGGAATTAGGATCCTTTATGGAATT CATAAGC	62	<i>Bam</i> HI
37	P0323-Pst_rev	TACTAATATCTGCAGTACTCCAAATA TATATCTGC	56	<i>Pst</i> I
38	P0437-Bam_fw	GGGGAAAGTGAATGGATCCAGTTAT TTATTTGAAG	66	<i>Bam</i> HI
39	P0437-Pst_rev	CTTTAATCCCCTTACTGCAGATCAAG AGATCCG	66	<i>Pst</i> I
40	P0903-Bam_fw	GAAGGGGAATTTTGGATCCTTTAAT AGATTGAAG	64	<i>Bam</i> HI
41	P0903-trunc- Bam_fw	GATTATAATAGTAGCGGATCCCAA TTCTATTG	59	<i>Bam</i> HI
42	P0903-Pst_rev	CGGAGATTTTTTATCTGCAGAGATCT GAAAACTCTATG	66	<i>Pst</i> I
43	P2730-Bam_fw	TAAAGGAGTTGGATCCAAAAACATT TGGATGG	66	<i>Bam</i> HI
44	P2730-Pst_rev	GCATTTGGGTTACTGCAGATTTTAGG AAATGAAATAG	66	<i>Pst</i> I
45	0323-Mitte_fw	AATGTTTGGGCTGACTAAAG	46	-
46	0323-Mitte_rev	AAGCCTTTCGCCATTAATTG	51	-
47	0437-Mitte_fw	ACAGGAGATCATTGGTAAGG	45	-
48	0437-Mitte_rev	CCCATACTACAATACTCTATC	42	-
49	0903-Mitte_fw	CTTCAAATTATGCCGGAAGC	52	-
50	0903-Mitte_rev	GCAGTTACAAGCCTTTCTTC	46	-

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Restr.- enzym/ Modifikation
51	pQE30_T5_F	CCCGAAAAGTGCCACCTG	54	-
52	pQE30_stop_R	CCGAGCGTTCTGAACAAATC	52	-
53	pQE_Insert_fw	CGGATAACAATTTACACACAG	48	-
54	P0323_revSalI	TACTAATAG TCGACT TACTCCAAATA TATATCTGC	56	<i>SalI</i>
55	P0437_revSalI	CTTTAATCCC TCGACT TAAATCAAG AGATCCG	66	<i>SalI</i>
56	P0903_revSalI	CGGAGATTTT TCGAC CTATAGATCT GAAAACTCTATG	66	<i>SalI</i>
57	P2730_revSalI	GCATTTGGG TCGACT TAAATTTTAGG AAATGAAATAG	65	<i>SalI</i>
58	P0323_RTrev	CAATAGGCATATACAAACAC	40	-
59	P0437_RTrev	TCTCTTGCTTCTTTATTAAC	39	-
60	P0903_RTrev	TATAGAGCAGACGATAAATG	40	-
61	P2730_RTrev	CTTGTTTCATCTCCATGTATC	41	-
62	Spo0A_fw	GTTCTCGATATAATAATGCC	46	-
63	Spo0A_rev	CACTATTAGTAGGTTTACC	45	-
64	gyrA_fw	CCAGTTGCAGGTTTCTTTTCG	52	-
65	gyrA_rev	ACGGATCACTTCCATCAGAC	48	-
66	CAC3319_291 292s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGAT AGCAAAGCTGTGCGCCCAGATAGGG TG	75	-
67	CAC3319_291 292s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACA GATAAGTCAAAGCTTGTAACCTTACCT TTCTTTGT	74	-
68	CAC3319_291 292s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTC TATCTCGATAGAGGAAAGTGTCT	73	-
69	CAC3319_257 258a-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAATT AACAATGGTGTGCGCCCAGATAGGG TG	74	-

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Restr.- enzym/ Modifikation
70	CAC3319_257 258a-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACA GATAAGTCAATGGTATTAACCTTACCT TTCTTTGT	73	-
71	CAC3319_257 258a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTT TAATCCGATAGAGGAAAGTGTCT	74	-
72	CAC0903_1369 1370s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGTA GACTAAGAGGTGCGCCCAGATAGGG TG	73	-
73	CAC0903_1369 1370s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACA GATAAGTCTAAGAGATTAACCTTACCT TTCTTTGT	71	-
74	CAC0903_1369 1370s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTT CTACTCGATAGAGGAAAGTGTCT	73	-
75	CAC0903_1568 1569s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATGC CGCAATAGTGTGCGCCCAGATAGGG TG	77	-
76	CAC0903_1568 1569s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACA GATAAGTCAATAGTGTTAACTTACCT TTCTTTGT	72	-
77	CAC0903_1568 1569s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTC GGCATCGATAGAGGAAAGTGTCT	78	-
78	CAC0323_1086 1087s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAATC TTCATTTCAAGTGCGCCCAGATAGGGT G	74	-
79	CAC0323_1086 1087s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACA GATAAGTCATTTTCATCTAACTTACCT TTCTTTGT	73	-
80	CAC0323_1086 1087s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTA AGATCCGATAGAGGAAAGTGTCT	74	-

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Restr.- enzym/ Modifikation
81	CAC0323_1320 1321s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAAT AACGATAAGGTGCGCCCAGATAGGG TG	74	-
82	CAC0323_1320 1321s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACA GATAAGTCGATAAGTATAACTTACCT TTCTTTGT	72	-
83	CAC0323_1320 1321s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTT TATTCCGATAGAGGAAAGTGTCT	74	-
84	CAC0437_1851 1852s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAAA ATCTATCTAGTGCGCCCAGATAGGGT G	72	-
85	CAC0437_1851 1852s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACA GATAAGTCTATCTAGATAACTTACCT TTCTTTGT	71	-
86	CAC0437_1851 1852s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTA TTTTCCGATAGAGGAAAGTGTCT	74	-
87	CAC0437_2046 2047s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATAT ACCAATTATGTGCGCCCAGATAGGGT G	72	-
88	CAC0437_2046 2047s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACA GATAAGTCAATTATGTAACTTACCT TTCTTTGT	72	-
89	CAC0437_2046 2047s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTG TATATCGATAGAGGAAAGTGTCT	73	-
90	pMTL007_F	TTAAGGAGGTGTATTTTCATATGACCA TGATTACG	62	-
91	pMTL007_R	AGGGTATCCCCAGTTAGTGTTAAGTC TTGG	61	-
92	EBS Universal	CGAAATTAGAACTTGCGTTCAGTAA AC	56	-

2.2 Zellanzucht

2.2.1 Nährmedien

Für Flüssigmedien wurden die Substanzen nach Einwaage in speziell aufgereinigtem Wasser (s. 2.3.2) gelöst und gegebenenfalls der pH-Wert des Mediums eingestellt. Anschliessend folgte die Sterilisierung für mindestens 20 min bei 121 °C und 1,2 bar Druck in einem Autoklaven.

Zur Herstellung fester Nährmedien (Agarplatten) wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Für anaerobe Agarplatten wurden die Substanzen eingewogen und in der Anaerobenkammer mit anaerobem Wasser gelöst. Nach dem Autoklavieren wurden die Platten in der Anaerobenkammer gegossen und dort, wie aerobe Platten auch, noch einige Tage zum Trocknen stehen gelassen. Bis zur Verwendung wurden alle Agarplatten bei 4 °C gelagert.

Zur Anfertigung anaerober Flüssigmedien, bei denen der pH-Wert eingestellt werden musste, wurden die eingewogenen Komponenten in aerobem Wasser gelöst, der pH-Wert eingestellt und das Medium vor dem Autoklavieren aufgeköcht, um gelösten Sauerstoff zu entfernen. Während des Abkühlens auf Eis wurde mit N₂ begast. Das Medium wurde anschließend luftdicht verschlossen, bevor es in der Anaerobenkammer in entsprechende Gefäße abgefüllt wurde.

Für die Herstellung anaerober Flüssigmedien, bei denen der pH-Wert nicht eingestellt werden musste, wurden die einzelnen Substanzen abgewogen und in der Anaerobenkammer mit anaerobem Wasser gelöst und abgefüllt. Um das Redoxpotential (als Indikator für den Sauerstoffgehalt) in allen anaeroben Medien durch einen Farbumschlag kontrollieren zu können, wurde der Redoxindikator Resazurin (1 mg/ml) zugesetzt. Bei Bedarf konnte dem Medium vor Gebrauch zusätzlich eine sterile, anaerobe Dithionitlösung (Endkonzentration $\leq 200 \mu\text{M}$) zugesetzt werden, um auch den restlichen Sauerstoff zu entfernen.

Allgemein wurden hitzelabile Komponenten separat gelöst, sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren dem abgekühlten Medium zugegeben.

2.2.1.1 LB-Medium [Sambrook et al., 2001]

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

2.2.1.2 TB-Medium (mod.) [Sambrook et al., 2001]

Trypton	12 g	1,2 % (w/v)
Hefeextrakt	23,9 g	23,9 % (w/v)
Na ₂ HPO ₄	9,4 g	10 mM
NaH ₂ PO ₄	2,2 g	2,5 mM
Glycerin (50 % (v/v))	16 ml	109 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.2.1.3 2 x YTG-Medium (mod.) [Oultram et al., 1988]

Glucose * H ₂ O	5 g	25 mM
Trypton	16 g	1,6 % (w/v)
Hefeextrakt	10 g	1,0 % (w/v)
NaCl	5 g	86 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.2.1.4 CB-Medium (mod.) [O'Brien und Morris, 1971]

Glucose * H ₂ O	10 g	50,5 mM
Casein-Hydrolysat	4 g	0,4 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 g	3,7 mM
K ₂ HPO ₄	0,5 g	2,9 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g	800 µM
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg	36 µM
MnSO ₄ * H ₂ O	10 mg	59 µM
Thiamin-HCl	2 mg	5,9 µM
p-Aminobenzoesäure	2 mg	16 µM
Biotin	0,1 mg	0,4 µM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Der pH-Wert wurde auf 6,9 eingestellt. Außerdem wurde L-Cystein-HCl * H₂O (Endkonzentration 1,4 mM) als Reduktionsmittel in das abgekühlte Medium vor dem Abfüllen in der Anaerobenkammer zugegeben.

2.2.1.5 CGM (ohne Selenalz) [Hartmanis und Gatenbeck, 1984]

Trypton	2 g	0,2 % (w/v)
Hefeextrakt	1 g	0,1 % (w/v)
Glucose * H ₂ O	50 g	252 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	15,14 mM
K ₂ HPO ₄	1 g	5,74 mM
KH ₂ PO ₄	0,5 g	3,67 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g	406 µM
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	15 mg	54 µM
CaCl ₂	10 mg	90 µM
MnSO ₄ * H ₂ O	10 mg	59 mM
CoCl ₂	2 mg	15 µM
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	2 mg	7 µM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.2.1.6 Phosphatlimitiertes Medium für kontinuierliche Kulturen (PL-Medium; mod.) [Bahl et al., 1982]

Glucose * H ₂ O	40 g	202 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	15,1 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g	400 µM
KH ₂ PO ₄ * 3 H ₂ O	50 mg	380 mM
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	15 mg	54 µM
MnSO ₄ * H ₂ O	15 mg	88 µM
NaCl	10 mg	170 µM
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg	68 µM
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	10 mg	41 µM
Thiamin-HCl	2 mg	5,9 µM
p-Aminobenzoesäure	2 mg	16 µM
Biotin	0,1 mg	0,4 µM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.2.1.7 Phosphatlimitiertes Minimalmedium, MES-gepuffert [Bertram et al., 1990]

Glucose * H ₂ O	40 g	202 mM
MES	21,3 g	100 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	15,1 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g	400 µM
KH ₂ PO ₄	0,1 g	700 µM
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	15 mg	54 µM
MnSO ₄ * H ₂ O	15 mg	89 µM
NaCl	10 mg	170 µM
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg	68 µM
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	10 mg	41 µM
Thiamin-HCl	2 mg	5,9 µM
p-Aminobenzoessäure	2 mg	16 µM
Biotin	0,1 mg	0,4 µM
Na-Thioglycolat	0,5 g	4,4 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt.

2.2.1.8 SOB-Medium [Sambrook et al., 2001]

Trypton	5 g	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	1,5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	0,14 g	10 mM
KCl	50 mg	2,5 mM
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,51 g	10 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,61 g	10 mM
H ₂ O	ad 250 ml	

Die Magnesiumsalze wurden getrennt autoklaviert und vor Gebrauch dem Restmedium zugegeben.

2.2.1.9 SOC-Medium [Dower et al., 1988]

Trypton	20 g	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	0,59 g	10 mM
KCl	0,19 g	2,5 mM
MgCl * 6 H ₂ O	2,03 g	10 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	2,46 g	10 mM
Glucose * H ₂ O	3,96 g	20 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.2.1.10 Medienzusätze

Alle Medienzusätze wurden als Stammlösung hergestellt, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Zugabe erfolgte bei Flüssigmedien vor Gebrauch, bei Medien für Agarplatten nach Abkühlung auf 50-60 °C. Lichtempfindliche Lösungen (X-Gal, Tetracyclin) oder Platten wurden dunkel gelagert. In folgender Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten und für die Selektion von *E. coli* und *C. acetobutylicum* nötigen Antibiotika und ihre Wirkkonzentrationen aufgeführt. Abweichungen davon sind dem Text zu entnehmen. Die Lösungsmittel der einzelnen Substanzen sind in Klammern angegeben.

Tabelle 4: Antibiotika zur Kultivierung rekombinanter *E. coli*- und *C. acetobutylicum*-Stämme.

Substanz	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]	
		<i>E. coli</i>	<i>C. acetobutylicum</i>
Ampicillin, Na-Salz	100 (H ₂ O)	100	-
Chloramphenicol	25 (96 % (v/v) Ethanol)	25	-
Clarithromycin ⁵	25 (H ₂ O)	-	5
Erythromycin	25 (50 % (v/v) Ethanol)	50	-
Kanamycin	50 (H ₂ O)	50	-
Spectinomycin	50 (H ₂ O)	50	-
Tetracyclin ⁶	12,5 (H ₂ O)	12,5	-
Thiamphenicol	25 (H ₂ O)	-	25
IPTG ⁷	-	240	-

2.2.1.11 Induktion der Blau-Weiß-Selektion

Zur erfolgreichen Blau-Weiß-Selektion der Kolonien wurden die Agarplatten vorher mit einer X-Gal-Lösung (80 µl einer 20 mg/ml konzentrierten Stammlösung, gelöst in DMF) und einer IPTG-Lösung (40 µl einer 30 mg/ml konzentrierten Stammlösung, gelöst in Ethanol abs.) behandelt. Vor dem Ausplattieren der Transformationsansätze wurden die Platten bei 37 °C für ca. 30 min in den Brutschrank gelegt, damit die Lösungsmittel verdampfen konnten und das Wachstum der Bakterien nicht störten.

2.2.2 Zellanzucht

2.2.2.1 Statische Kultur

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte üblicherweise in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium. Waren größere Volumina erforderlich, wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37 °C auf einem Rundschüttler bei 120-200 Upm. Agarplatten wurden bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

5: Zur Herstellung der Lösung wurde die Substanz zuerst in Wasser gelöst (pH 2, mit 2 M HCl eingestellt) und anschließend der pH-Wert mit 2 M NaOH tropfenweise wieder auf 6,5 angehoben; ein zu alkalischer pH-Wert führt zum Ausfallen des Clarithromycins.

6: Lichtempfindlich

7: Die IPTG-Lösung zur Induktion von Genexpressionen wurde stets frisch kurz vor Gebrauch mit H₂O angesetzt.

Die Kultivierung von *C. acetobutylicum* erfolgte bis zu einem Volumen von 5 ml anaerob in Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc.; Vineland; USA) mit Butylstopfen und Schraubdeckeln bei 37 °C im Brutschrank. Größere Volumina wurden in 125-ml-, 500-ml- und 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) mit Naturgummistopfen und Edelstahldeckel angezogen. Als Inokulum wurden 50-250 µl (üblicherweise 1 % (v/v)) einer Sporensuspension 10 min bei 80 °C pasteurisiert und anschließend mit einer sterilen Spritze in das vorbereitete Medium (5 ml CGM) injiziert. Aufgrund der starken Gasentwicklung von *C. acetobutylicum* wurden die Flaschen nur zur Hälfte mit Medium befüllt und bei längeren Inkubationszeiten regelmäßig mit Hilfe einer sterilen Kanüle ein Druckausgleich vorgenommen.

2.2.2.2 Kontinuierliche Kultur

Kontinuierliche Kulturen wurden mit Volumina im Fermenter von 0,7-1 l durchgeführt. Dabei wurde das Fermentergefäß mit kalibrierter pH-Elektrode und 700 ml CB-Medium autoklaviert. Um nahezu anaerobe Bedingungen für *C. acetobutylicum* zu schaffen, wurde das Medium im Fermenter noch in heißem Zustand mit N₂ begast und langsam auf 37 °C abgekühlt. Die Starterkultur bestand aus 50 ml einer logarithmisch wachsenden *C. acetobutylicum*-Kultur. Nach deutlicher OD₆₀₀-Zunahme und dem Absinken des pH-Wertes im Fermentergefäß wurde die Durchmischung (Rührwerk mit 250 Upm) und der Zufluß von frischem, nicht anaerobisiertem, phosphatlimitierten Medium (Durchflußrate 60 ml/h) gestartet. Ein pH-Wert von 5,8 wurde durch Zugabe von 4 M KOH konstant gehalten. Damit die Kultur im Fermenter einen bestimmten Pegelstand nicht überschritt, wurde das Kulturvolumen durch stetiges Abpumpen von „verbrauchtem“ Medium konstant gehalten. So konnte die Kultur im Fermenter beliebig lange in der logarithmischen Phase bei einer OD₆₀₀ von ca. 3 gehalten werden.

Zu einem selbst definierten Zeitpunkt wurde die pH-Kontrolle abgeschaltet. Säurequelle waren die Fermentationsprodukte der Bakterien selbst und zugeführtes PL-Medium, das auf einen pH von 2 eingestellt worden war. Sollte im Wachstumsversuch eine Induktion der Lösungsmittelbildung stattfinden, wurde der pH-Sollwert auf 4,5 eingestellt. Über einen Probennehmer mit einem verschließbaren Luer-Lock-Verschluss und austauschbarer Kanüle erfolgte die Probennahme in regelmäßigen Abständen direkt aus dem Fermentergefäß in vorher vakuumisierte Hungate-Röhrchen bzw. Müller-Krempel-Flaschen.

2.2.2.3 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *E. coli*-Stämmen erfolgte, indem 0,5 ml einer über Nacht, gegebenenfalls unter selektiven Bedingungen, gewachsenen Kultur mit 0,5 ml 100%igem Glycerin versetzt und bei -70 °C gelagert wurden.

Clostridium acetobutylicum wurde in Form von Sporensuspensionen aufbewahrt. Zur Herstellung dieser wurden 900 µl CGM mit 100 µl einer Übernachtskultur (ebenfalls in CGM gewachsen) angeimpft und für 6-8 h bei 37 °C inkubiert. Verschiedene, mit frischem CGM hergestellte Verdünnungen dieser logarithmisch wachsenden Kultur wurden dann anaerob auf CGM-Platten (gegebenenfalls unter selektiven Bedingungen) ausplattiert. Hierfür wurden jeweils 100 µl der 10⁻⁴- bis 10⁻⁶-Verdünnung verwendet. Mit Parafilm verschlossen wurden die Platten ca. 5-7 Tage bei 37 °C inkubiert. Mit 5 ml frischem CGM wurden die Sporen unter aeroben Bedingungen mit Einwegimpfösen von den Platten abgelöst, aliquotiert und in 2-ml-Schraubdeckelröhrchen bei -20 °C aerob aufbewahrt. Unter dem Mikroskop konnten die Sporenpräparationen kontrolliert werden. Zur Reaktivierung der Sporen s. 2.2.2.1).

2.2.3 Bestimmung von Wachstumsparametern

2.2.3.1 Messung der optischen Dichte

Um den Wachstumsverlauf einer Bakterienkultur zu verfolgen, wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einer 1-ml-Halbmikroküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer bestimmt. Als Referenzwert diente entsprechendes Medium. Überschreitet die optische Dichte einen Wert von 0,3, wurde die Probe mit Medium verdünnt, um eine Linearität zwischen der Zunahme der Extinktion und der Zellzahl zu gewährleisten.

2.2.3.2 Messung des externen pH-Wertes

Der pH-Wert von Kulturüberständen konnte mit einem Präzisions-pH-Meter gemessen werden. Um eine Verschmutzung des Diaphragmas der pH-Elektrode zu vermeiden, wurden die Proben vor der Messung 10 min bei 14000 * g und RT zentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung in ein Reagenzglas überführt. Außerdem wurde vor jeder Messung das pH-Meter, abhängig vom erwarteten Messbereich, mit externen Standards pH 4 und pH 7 bzw. pH 7 und pH 9 kalibriert.

2.2.3.3 Gaschromatographische Analyse des Produktspektrums

Das Produktspektrum von *C. acetobutylicum*-Kulturen wurde gaschromatographisch bestimmt und quantifiziert. Hierfür wurden von jeder Probennahme 2 ml Kultur abzentrifugiert (10 min, 14000 * g, RT) und davon 1 ml Überstand in ein 1-ml-Rollrandglas (Chrompack GmbH, Frankfurt) überführt. Jeder Probe wurden 100 µl eines internen Standards (110 mM Isobutanollösung, gelöst in 2 N Salzsäure) zugegeben. Mit einer Serumkappe wurde das Gefäß anschließend gasdicht verschlossen. Über einen automatischen Probengeber wurde jeweils 1 µl einer jeden Probe auf die Säule aufgetragen. Unter folgenden Bedingungen wurden die Proben dann im Gaschromatographen analysiert:

Säule:	Glas, gepackt, ID 2 mm
Säulenmaterial:	Chromosorb 101 mit 80 bis 100 mesh
Injektortemperatur:	195 °C
Detektor:	FID, 230 °C
Trärgas:	N ₂ (15 ml/min)
Brennergase:	H ₂ (30 ml/min) Synthetische Luft ⁸ (250 ml/min) N ₂ (15 ml/min)
Temperaturprofil:	130 °C für eine Minute; 130 °C bis 150 °C mit 4 °C/min; 150 °C bis 160 °C mit 5 °C/min; 160 °C bis 180 °C mit 7 °C/min; 180 °C bis 200 °C mit 10 °C/min; 200 °C für 3 Minuten

Das Analyseprogramm Maestro Sampler II Version 2.5 (Chrompack GmbH, Frankfurt) wurde zu Auswertung am PC herangezogen. Mit Hilfe von Kalibrierläufen mit bekannten Konzentrationen (5 mM) an Acetat, Acetoin, Aceton, Butanol, Butyrat und Ethanol konnten im Vergleich zum internen Standard Isobutanol (10 mM) die Produktkonzentrationen bestimmt werden. Für eine aussagekräftige Auswertung durfte also auch die Konzentration der einzelnen Substanzen in den Kulturüberständen 5 mM nicht übersteigen. Die Kulturüberstände wurden deshalb bei Bedarf mit Wasser entsprechend verdünnt. Die automatische Auswertung beruhte letztendlich auf der vergleichenden Signalflächenberechnung der Kalibrierung und des internen Standards.

8: Bestehend aus 80 % N₂ und 20 % O₂

2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.3.1 Vorbehandlung von Lösungen und Geräten

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden vor Gebrauch bei 121 °C für mindestens 15 Minuten bei 1,2 bar Druck autoklaviert, um eventuell vorhandene Kontaminationen zu beseitigen und Nukleasen zu inhibieren. Gegenstände wie Drigalski-Spatel oder Kleingeräte aus Metall wurden vor Gebrauch abgeflammt. Hitzeempfindliche Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol ausgespült oder abgewischt. Hitzelabile Lösungen wurden vor Benutzung sterilfiltriert.

Um RNasen zu inhibieren, wurden bei Arbeiten mit RNA alle verwendeten Gegenstände doppelt autoklaviert und separat gelagert. Hitzeempfindliche Materialien sowie alle Arbeitsflächen wurden mit RNase-inaktivierender-Lösung („RNASE ZAP“) gespült oder abgewischt. Das bei RNA-Arbeiten verwendete Wasser wurde mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und nach einer Inkubation bei RT über Nacht zweimal autoklaviert. Grundsätzlich wurden bei allen Arbeiten mit RNA Einweghandschuhe getragen und ausschließlich gestopfte Spitzen (Biozym Scientific GmbH; Oldendorf) verwendet. Die Lagerung RNA-haltiger Lösungen erfolgte bei -70 °C. Vor Gebrauch wurde die RNA langsam auf Eis aufgetaut und auch während der gesamten Arbeiten auf Eis gehalten.

2.3.2 Wasser, Puffer und Lösungen

Das in dieser Arbeit speziell aufgereinigte Wasser stammte aus einem Ionenaustauscher Elgastat Maxima (USF Deutschland GmbH; Ransbach-Baumbach). Grundsätzlich wurden Minimalmedien und Puffer mit diesem Wasser hergestellt. Komplexmedien wurden mit demineralisiertem Wasser aus der hauseigenen Wasseranlage der Universität Ulm angesetzt. Der Einfachheit halber wird beides in der vorliegenden Arbeit als „Wasser“ bzw. H₂O bezeichnet.

Die für die Durchführung dieser Arbeit nötigen Puffer und Lösungen sind jeweils im Kapitel der entsprechenden Methodik angegeben.

2.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien

2.4.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *C. acetobutylicum*

Um Gesamt-DNA aus dem *C. acetobutylicum* zu isolieren, wurde nach einem Protokoll von Bertram und Dürre (1989) in modifizierter Form vorgegangen.

Hierfür wurden die Zellen aus 5 ml einer CGM-Übernachtskultur durch Zentrifugation ($3000 \times g$, 10 min, 4 °C) in einer Zentrifuge für Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc.; Vineland; USA) geerntet. Das Zellsediment wurde in 1 ml KP-Puffer (10 mM, pH 7,5) gewaschen und das Sediment in 500 µl KP-Puffer (10 mM, pH 7,5) aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen geschah mittels Lysozym (10 mg⁹). Zusätzlich erfolgte eine RNase-Behandlung durch Zugabe von 5 µl einer RNase A-Lösung (10 mg/ml, gebrauchsfertig von Fermentas GmbH; St. Leon-Rot), um unerwünschte RNA zu verdauen (s. 2.4.2). Die Probe wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor nacheinander die Zugabe von 50 µl einer 10%igen (w/v) SDS-Lösung und 30 µl einer Proteinase K-Lösung mit anschließender Inkubation für 1 h bei 55 °C erfolgte.

Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.5.1) wurde die DNA von allen unerwünschten Proteinen abgetrennt und anschließend mit Ethanol (s. 2.5.2) oder Isopropanol (s. 2.5.3) gefällt.

Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 100-200 µl H₂O aufgenommen und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Vor Gebrauch wurde die Konzentration der Nukleinsäure, wie in 2.5.10 beschrieben, bestimmt.

Proteinase K-Lösung:

20 mg/ml Proteinase K in 50 % (v/v) Glycerin

2.4.2 RNase-Behandlung von wässrigen DNA-Lösungen

Nach einer Isolierung chromosomaler DNA schloß sich eine RNase-Behandlung an, um darin noch enthaltene RNA zu entfernen. Im Normalfall wurden pro 1 ml DNA-Lösung 5 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml, gebrauchsfertig von Fermentas GmbH; St. Leon-Rot) zugegeben und

⁹: Lysozymaktivität: 900000 U/mg

für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten eine Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.5.1) und eine Fällung mit Ethanol (s. 2.5.2).

2.4.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum*

Bei der Gewinnung von RNA aus *C. acetobutylicum* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Oelmüller et al. (1990) verfahren. Aufgrund der geringen Stabilität der RNA musste darauf geachtet werden, dass die Zellen nach der Probennahme schnell verarbeitet wurden.

Hierfür erfolgte die Abnahme von 2 ml Bakterienkultur, die sofort zentrifugiert wurden (15000 * g, 2 min, 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes konnte entweder direkt die Isolation der RNA angeschlossen werden oder das Zellsediment wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Isolierung der RNA bei – 70 °C gelagert.

Für die Isolation der RNA wurden die Zellsedimente zweier Reaktionsgefäße in 700 µl ASE-Puffer suspendiert und anschließend je 350 µl dieser Suspension in jeweils 700 µl 60 °C heiße Roti®-Aqua-P/C/I-Lösung¹⁰ pipettiert. Nach kräftigem Mischen auf dem „vortexer“ wurden die Proben für ca. 10 min bei 60 °C auf einem Heizblock inkubiert, wobei sie immer wieder kräftig geschüttelt wurden. Nach einer kurzen Abkühlung der Ansätze auf Eis folgte zur Phasentrennung ein Zentrifugationsschritt (15000 * g, 5-10 min, 4 °C). Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und pro Ansatz mit 0,1 Vol. einer Na-Acetat-Lösung (3 M, pH 5,2) versetzt. Nach Zugabe von jeweils 700 µl kalter Roti®-Aqua-P/C/I-Lösung und kräftigem Mischen auf dem „vortexer“ wurden die Proben erneut zentrifugiert (15000 * g, 5-10 min, 4 °C). Die Extraktion der wässrigen Phase wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Zu bemerken ist hierbei, dass die Proben nur nach der ersten Behandlung mit heißer Phenol-Lösung mit Na-Acetat versetzt wurden und in den weiteren Schritten nur noch kaltes Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch verwendet wurde.

War keine Protein-Interphase mehr zu erkennen, erfolgte die Fällung der RNA durch 2,5 Vol. Ethanol abs. (s. 2.5.2).

Die in 50 µl DEPC-Wasser (s. 2.3.1) aufgenommene RNA wurde bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert oder es folgte direkt eine DNase-Behandlung (s. 2.4.5), wodurch noch vorhandene unerwünschte DNA aus den RNA-Proben entfernt wurde.

10: Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 25:24:1, (v/v/v); für RNA-Isolierung; pH 4,5-5

Die Konzentration der RNA in den einzelnen Ansätzen konnte, wie in 2.5.10 beschrieben, bestimmt werden.

ASE-Puffer: pH 5,5, mit Eisessig eingestellt

Na-Acetat	164 mg	20 mM
EDTA	37 mg	1 mM
SDS	5 mg	173,4 μ M
H ₂ O	ad 100 ml	

2.4.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli* mittels „RNeasy™-Mini Kit“

Zur Isolierung kleinerer Mengen RNA aus *E. coli* wurde der „RNeasy™-Mini-Kit“ verwendet. Die Isolierung aus 1×10^9 Zellen wurde strikt nach Angaben des Herstellers mit folgenden Ausnahmen durchgeführt:

- Die Lyse der Zellen erfolgte mit 1 mg/ml Lysozym¹¹ für 15 min bei RT.
- Eine zusätzliche DNase-Behandlung auf der Säule fand bei 32 °C für 30 min, ansonsten aber nach Herstellerangaben, statt.
- Die RNA wurde mit 50 μ l DEPC-Wasser (s. 2.3.1) von der Säule eluiert, wobei dieser Elutionsschritt mit dem gleichen Eluat einmal wiederholt wurde, um die Ausbeute zu erhöhen.

Eventuell schloss sich daran eine weitere DNase-Behandlung, wie in 2.4.5 beschrieben, an.

2.4.5 DNase-Behandlung von wässrigen RNA-Lösungen

Nach der Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte eine DNase-Behandlung, um die in der RNA-Lösung unerwünschte DNA zu entfernen.

Hierbei wurden RNase-freie DNasen verschiedener Hersteller (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet, wobei immer die jeweiligen Angaben zur Durchführung und Zusammensetzung der Ansätze genau beachtet wurden.

¹¹: Lysozymaktivität: 900000 U/mg

Im allgemeinen schloss sich daran eine Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.5.1) und eine Fällung mit Ethanol (s. 2.5.2) an.

Um eine von DNA vollständig freie RNA-Lösung zu erhalten, konnte die DNase-Behandlung mehrmals erfolgen. Das Sediment wurde schließlich in 20-50 µl DEPC-Wasser (s. 2.3.1) aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

Die vollständige Entfernung von DNA wurde mit einer Standard-PCR (s. 2.8.1) überprüft, wobei nach Auftragung der PCR auf ein nicht-denaturierendes Agarose-Gel (s. 2.6.1) keine spezifischen DNA-Fragmente mehr zu sehen sein durften.

2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA

2.4.6.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Zellhydrolyse nach einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (1979).

Zunächst wurden 2 ml einer Übernachtskultur sedimentiert (14000 * g, 1 min, RT). Das Zellsediment wurde in 300 µl Puffer P1 suspendiert und der Versuchsansatz nach Zugabe von 300 µl Puffer P2 für 5 min bei RT inkubiert. Gelegentliches vorsichtiges Invertieren sollte zur möglichst vollständigen alkalischen Lyse der Zellen führen. Nach dem ZellAufschluss wurden dem Ansatz 300 µl Puffer P3 zugesetzt und alles durch erneutes Invertieren gründlich gemischt. Die bei der Lyse angefallenen Zellwandfragmente, ausgefallenen Proteine und chromosomale DNA wurden durch eine anschließende Zentrifugation (14000 * g, 10 min, RT) entfernt.

Nach der Überführung des klaren Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß, folgte eine Isopropanol-Fällung (s. 2.5.3).

Das gereinigte DNA-Sediment wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und bei – 20 °C gelagert.

Die Konzentration an Nukleinsäure wurde photometrisch bestimmt (s. 2.5.10).

Puffer P1:

RNase A (10 mg/ml)	1 ml	0,0001 % (w/v)
Tris-HCl (1 M, pH 8)	5 ml	50 mM
EDTA (0,5 M, pH 8)	1 ml	5 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

Puffer P2: stets frisch angesetzt

SDS (10 % (w/v))	10 ml	38 mM
NaOH (10 M)	2 ml	200 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

Puffer P3: pH 5,5, mit 3 M Essigsäure (s. 2.5.2) eingestellt

Na-Acetat	24,6 g	3 M
H ₂ O	ad 100 ml	

2.4.6.2 Midi-Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Bei der Midi-Plasmidpräparation handelt es sich um eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse nach Sambrook et al. (2001). Mit dieser Methode lässt sich Plasmid-DNA in größerer Menge und Reinheit gewinnen.

Für Midi-Plasmidpräparationen wurden die *E. coli*-Zellen in 2 x YTG-Medium angezogen. In diesem Medium wächst *E. coli* zu einer höheren optischen Dichte als in LB-Medium heran, wodurch die Ausbeute an Plasmid-DNA erhöht wird.

Die Zellen einer 50 ml ÜN-Kultur wurden in ein 50-ml-Falcon-Gefäß überführt und für 10 min bei 4 °C und 14000 * g sedimentiert. Das Sediment wurde anschließend in 5 ml Lösung A suspendiert. Zur besseren Lyse der Zellwand erfolgte die Zugabe einer Spatelspitze (ca. 5 mg) Lysozym¹² und die Inkubation des Ansatzes für 10 min auf Eis. Anschließend wurden 10 ml frisch angesetzte Lösung B zugegeben und der Ansatz nach kurzem Schütteln erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 7,5 ml Lösung C, kurzem Mischen und erneuter Inkubation für 10 min auf Eis wurden Proteine, chromosomale DNA und

¹²: Lysozymaktivität: 900000 U/mg

Zelltrümmer bei 14000 * g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Abtrennung weiterer Zellbestandteile, die durch die Zentrifugation nicht sedimentiert werden konnten, durch eine sterile Mullbinde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und einer Inkubation für ca. 2 min bei Raumtemperatur. Das Plasmid-haltige Sediment wurde nach Zentrifugation (14000 * g, 10 min, 4 °C) zum Abdampfen des Isopropanols getrocknet und anschließend in 2 ml H₂O suspendiert.

Zum Fällen von RNA wurden 2 ml 5 M LiCl/50 mM Tris-HCl (pH 7,5) (s. 2.5.4) zugegeben und der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Die RNA wurde durch anschließende Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 14000 * g sedimentiert und die DNA im Überstand mit 10 ml eiskaltem (-20 °C) Ethanol abs. für mind. 2 Stunden bei -20 °C gefällt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zentrifugation bei 4 °C und 14000 * g für 30 min sedimentiert. Das getrocknete Sediment wurde in 400 µl TE-Puffer (s. 2.5.2) gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend erfolgte zum Abbau weiterer RNA eine RNase-Behandlung für 30 min bei 37 °C nach Zugabe von 5 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml). Um kontaminierende Proteine zu entfernen, wurde eine zweimalige Phenolextraktion (s. 2.5.1) durchgeführt. Zur Entfernung von Phenolresten folgte eine zweimalige Chloroform-Behandlung (s. 2.5.1).

Daran schloss sich eine Ethanol-fällung (s. 2.5.2) an.

Das DNA-haltige Sediment wurde nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge in 100 µl H₂O suspendiert. Die gelösten Plasmide wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch quantifiziert (s. 2.5.10).

Lösung A: pH 8 (mit HCl eingestellt)

Glucose	10 g	50 mM
Tris	3 g	25 mM
EDTA	3,7 g	10 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Lösung B: stets frisch angesetzt, pH 8

NaOH (10 N)	100 µl	0,2 N
SDS (10 % (w/v))	500 µl	38 mM
H ₂ O	ad 5 ml	

Lösung C: pH 5,2

Ka-Acetat	295 g	3 M
Eisessig	11,5 ml	201,1 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.4.6.3 Plasmid-Minipräparation mittels Säulenchromatographie aus *E. coli*

Eine alternative Methode zur schnellen Gewinnung von sauberer Plasmid-DNA stellte die Verwendung des käuflich erhältlichen Plasmid-Kits „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ dar.

Dieses Verfahren zur DNA-Isolation beruht auf der durch chaotrope Salze vermittelten selektiven Bindung von DNA an eine Glasfasermatrix nach Aufschluss der Zellen durch alkalische Lyse. Nach Reinigung der DNA mit einer ethanolhaltigen Lösung erfolgte die Elution mit Wasser oder einem Puffer geringer Ionenstärke. Die auf diese Art erhaltene DNA war so sauber, dass sie direkt in Sequenzierungsreaktionen (s. 2.8.7) eingesetzt werden konnte.

Im Normalfall wurden für die Plasmid-Isolierung 4 ml einer Übernachtskultur verwendet. Die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte erfolgte streng nach Angaben des Herstellers und unter Berücksichtigung aller optionalen Schritte. Die DNA wurde anschließend mit 50 µl Wasser von der Säule eluiert.

Die Quantifizierung der Plasmid-DNA erfolgte wie in 2.5.10 beschrieben.

2.4.6.4 Plasmidpräparation mittels Säulenchromatographie aus *C. acetobutylicum*

Die Präparation von Plasmiden aus *C. acetobutylicum* erfolgte analog der Präparation aus *E. coli* (s. 2.4.6.3) mit dem „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ nach Angaben des Herstellers unter Berücksichtigung aller optionalen Schritte. Jedoch war die Qualität wie auch die Quantität der so gewonnenen Plasmid-DNA für die meisten Versuche, wie z. B. Sequenzierung (s. 2.8.7) oder Restriktionsverdau (s. 2.7.1), nicht ausreichend.

3 µl der so präparierten Plasmid-DNA wurden deshalb in kaltkompetente *E. coli* XL2-Blue-Zellen transformiert (s. 2.9.1), über Nacht unter entsprechender Antibiotikaselektion inkubiert und am nächsten Tag, wie in 2.4.6.3 beschrieben, präpariert. Somit stand Plasmid-DNA in ausreichender Qualität und Quantität zur Verfügung.

2.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Proteinen aus DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion, gefolgt von einer Ethanol-fällung, durchgeführt. Die Erhöhung der Ionenkonzentration durch Zugabe von 10 % (v/v) 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2, mit 3 M Essigsäure eingestellt) wurde vor der Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen, was zu einer besseren Denaturierung der Proteine führt [Wallace, 1987].

Die Extraktion erfolgte mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung [Sambrook et al., 2001], wobei Roti®-P/C/I¹³ bzw. Roti®-Aqua-P/C/I¹⁴ verwendet wurde.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Phasen kräftig gemischt. Anschließend wurde die Phasentrennung durch Zentrifugieren (14000 * g, 5 min, RT) unterstützt. Je nach Stärke der Proteinverunreinigung musste die Prozedur so oft wiederholt werden, bis nach der Zentrifugation keine Protein-Interphase mehr sichtbar war. Die DNA- bzw. RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Gegebenenfalls wurde die wässrige Lösung anschließend zur Entfernung der Phenolreste mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1 (v/v)) versetzt [Wallace, 1987]. Wieder folgten gründliches Mischen und eine sich daran anschließende Zentrifugation (14000 * g, 5 min, RT).

Anschließend wurde die im Überstand vorliegende wässrige DNA- bzw. RNA-Lösung zur Konzentrierung einer Ethanol-fällung (s. 2.5.2) unterzogen.

2.5.2 Ethanol-fällung

Zur Fällung von Nukleinsäuren wurde der wässrigen Lösung, wenn nicht in einem vorherigen Schritt bereits geschehen, Na-Acetat-Lösung (3 M, pH 5,2, mit 3 M Essigsäure eingestellt) bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M zugegeben und gemischt. Anschließend erfolgten die

13: Verhältnis 25:24:1 (v/v/v), zur DNA-Isolierung, pH 7,5-8

14: Verhältnis 25:24:1 (v/v/v), zur RNA-Isolierung, pH 4,5-5

Zugabe von 2,5 Vol. -20 °C kaltem Ethanol abs. und erneutes Mischen der Probe. Nach einer Inkubation von mind. 30 min bei -20 °C (wahlweise über Nacht), wurde die präzipitierte DNA bzw. RNA durch Zentrifugation (14000 * g, 30 min, 4 °C) sedimentiert, einmal mit 1 ml 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen und erneut für 10 min bei 14000 * g und 4 °C zentrifugiert. Das Trocknen des Sediments erfolgte in einer Vakuumzentrifuge. Anschließend konnte das trockene Nukleinsäure-Sediment in 50 µl H₂O (bei RNA: DECP-Wasser (s. 2.3.1) oder TE-Puffer aufgenommen werden.

TE-Puffer: pH 8

Tris-HCl (1 M)	10 ml	10 mM
EDTA	0,38 g	1 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

3 M Essigsäure:

Eisessig	17 ml
H ₂ O	ad 100 ml

2.5.3 Isopropanolfällung

Zur Durchführung einer Isopropanolfällung wurde der wässrigen DNA-Lösung 0,7 Vol. Isopropanol (2-Propanol) zugegeben, gemischt und zentrifugiert (14000 * g, 10 min, RT). Die weitere Aufarbeitung der Sedimente erfolgte analog zu 2.5.2. Im Gegensatz zur Ethanolfällung wurden hier keine Salze zur leichteren Fällung der DNA zugegeben, da Isopropanol das Mitausfallen von Salzen stärker begünstigt als Ethanol.

2.5.4 Lithiumchloridfällung

Die Fällung mit LiCl wurde während einer Plasmidpräparation dazu verwendet, um RNA spezifisch aus einer wässrigen Lösung zu fällen. Hierzu wurde dem Ansatz 1 Vol. einer 5 M LiCl/50 mM Tris-HCl-Lösung (pH 7,5) hinzugegeben und für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch einen Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur und 14000 * g für 15 min sedimentiert und die DNA-haltige Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.5.5 Dialyse von DNA

Teilweise wurden Ligationen mittels Mikrodialyse entsalzt, um später größere Volumina in eine Transformation durch Elektroporation (s. 2.9.2) einsetzen zu können. Dabei wurde pro Ansatz eine Petrischale mit sterilem H₂O gefüllt und ein Dialysefilterplättchen so auf die Wasseroberfläche gelegt, dass kein Wasser die Oberseite des Filters benetzte. Darauf wurde der Ligationsansatz getropft und für ca. 30 min bei RT inkubiert. Der DNA-Tropfen konnte nun vom Filter pipettiert und in die Transformation eingesetzt werden.

2.5.6 Reinigung von DNA mittels „UltraClean™15 DNA Purification Kit“

PCR-Produkte und beispielsweise DNA-Lösungen nach einem Restriktionsverdau wurden bevorzugt mit dem „UltraClean™15 DNA Purification Kit“ aufgereinigt, da mit diesem in kürzester Zeit optimal aufgereinigte DNA-Lösungen erhalten werden können.

Die Reinigung beruht auf der reversiblen Bindung von DNA an eine Silica-Matrix unter Einfluss hochmolarer, chaotroper Salze (hier: Natrium-Jodid).

Die Reinigung wurde strikt nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei 7 µl der Silica-Matrix-Lösung (Glasmilch) pro Ansatz normalerweise ausreichend waren und die Elution der DNA mit ca. 50 % des eingesetzten Volumens, aber mit mind. 15 µl H₂O durchgeführt wurde, um Verunreinigungen durch die Glasmilch zu verringern.

2.5.7 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Auch für die Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen wurde der „UltraClean™15 DNA Purification Kit“ verwendet.

PCR-Produkte oder mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA wurden zur analytischen und präparativen Auftrennung einer nicht-denaturierende Gelelektrophorese (s. 2.6.1) unterzogen. Nach Auftragen der DNA auf ein 0,8 oder 2%iges Agarose-Gel und Anfärben mit EtBr, konnte das gewünschte Fragment auf einem UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und ausgeschnitten werden. Bei dieser Wellenlänge wird die DNA am wenigsten beschädigt (Hauptabsorptionsmaximum bei 260 nm).

Anschließend wurde die Reinigung der DNA, unter Berücksichtigung der in 2.5.6 genannten Ausnahmen, nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.8 Reinigung von DNA mittels Mikrokonzentratorsäulen

Eine weitere Möglichkeit, DNA zu entsalzen und zu konzentrieren bzw. von, nach einer PCR noch vorhandenen, Oligonukleotiden, dNTPs und anderen DNA-Fragmenten kleiner als 100 Bp zu trennen, war die Anwendung von „Microcon® YM100“-Konzentratoren. Hierfür wurden bis zu 50 µl DNA-Lösung mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt und auf die Separationsmembran pipettiert. Nun wurde so lange zentrifugiert (ca. 10 min, 500 * g, RT), bis das Volumen über der Membran nur noch etwa 50 µl betrug. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, um eine ausreichende Reinigung zu erreichen. Die Wiedergewinnung der DNA erfolgte durch umgedrehtes Einsetzen der Konzentratorsäule in ein neues steriles Reaktionsgefäß und einen abschließenden Zentrifugationsschritt für 1 min bei 14000 * g und RT.

2.5.9 Reinigung radioaktiv markierter DNA mit „MicroSpin™ G-25 Columns“

Die Abtrennung nicht eingebauter radioaktiv markierter Nukleotide erfolgte durch Gelfiltration in einer Sephadex®-G-25-Matrix. Dabei werden Moleküle ab einer bestimmten Größe aus der Matrix ausgegrenzt und deshalb zuerst eluiert. Kleinere Moleküle migrieren durch die Poren der Matrix und eluieren in Abhängigkeit ihrer Größe später. Die „MicroSpin™ G-25“-Säulen wurden nach Angaben des Herstellers verwendet und jeweils 20 µl Probe auf die Säule pipettiert.

2.5.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte photometrisch in einer 100 µl Quarzglasküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Proben wurden im Normalfall 1:50 verdünnt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde für eine Absorption von 1 eine Menge von 50 µg DNA pro ml (bzw. 40 µg RNA pro ml) angenommen [Sambrook et al., 2001]. Um die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung zu ermitteln, erfolgte zusätzlich die Absorptionsmessung bei $\lambda = 280$ nm und die Berechnung des Quotienten aus A_{260} zu A_{280} . Bei Werten von 1,8 bis 2 bei DNA (bei RNA: 2 bis 2,2) wurde von einer reinen Nukleinsäurelösung ausgegangen [Sambrook et al., 2001]. Höhere Werte stehen für Phenol- und Proteinverunreinigungen.

Zur Quantifizierung von DNA-Fragmenten in Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gelen konnte die zu bestimmende Bande auch durch den Vergleich der Intensität mit Banden des ebenfalls aufgetragenen Größenstandards „GeneRuler™“ abgeschätzt werden. Dieser besteht

aus Banden definierter DNA-Konzentrationen. Da die Nachweisgrenze von Nukleinsäuren im Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel bei ca. 20-25 ng liegt und das Interpretieren der Farbintensität der Banden nach subjektivem Empfinden vorgenommen wurde, handelte es sich hierbei lediglich um eine schnelle und nicht zwingend exakte Möglichkeit der Abschätzung von Nukleinsäure-Konzentrationen.

2.6 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten

2.6.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Größenbestimmung und zur Mengenabschätzung von DNA-, aber auch zur Qualitätsüberprüfung von RNA-Fragmenten sowie zur Überprüfung von Restriktionsansätzen und PCR-Produkten verwendet. Hierbei werden die Fragmente in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei man sich die negative Ladung der Phosphatgruppe im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrad der Nukleinsäuren zu Nutze macht und dadurch die Nukleinsäure-Moleküle zur Anode wandern. Allgemein fungiert die elektrisch neutrale Gelmatrix hierbei als eine Art Sieb, wodurch kleinere Fragmente schneller wandern als große [Sambrook et al., 2001]. Aber auch die Konformation des Nukleinsäure-Moleküls, die angelegte Spannung sowie die Agarosekonzentration beeinflussen die Geschwindigkeit der wandernden Fragmente.

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Agarosekonzentration zwischen 0,8 % ((w/v), in 1 x TAE-Puffer gelöst; > 1000 Bp) und 2 % ((w/v), in 1 x TAE-Puffer gelöst; < 1000 Bp) gewählt. Falls Fragmente aufgetrennt werden sollten, deren Größe sich in nur 50 bis 80 Bp unterschied, wurde die Agarose z. T. 4%ig in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und gelöst.

Die flüssige Agarose-Lösung wurde in Gelkammern eigener Bauart (100 x 70 x 3 mm) gegossen, wobei sofort ein Kamm ins Gel eingebracht wurde. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde dieses mit 1 x TAE-Puffer beschichtet und der Kamm wieder entfernt. Die so entstandenen Taschen konnten nun mit den Proben, die zuvor mit 0,2-0,5 Vol. Ladepuffer versetzt worden waren, beladen werden. Zur Größenbestimmung wurde neben den zu untersuchenden Proben ein Größenstandard (s. 2.6.4) aufgetragen. Bei einer Spannung von 80-140 V erfolgte anschließend die Auftrennung der Fragmente, die abhängig von der Agarosekonzentration zwischen 30 und 60 min benötigte. Hierbei konnte der Fortschritt der Auftrennung anhand der Farbstoffe, die dem Laufpuffer zugesetzt waren, verfolgt werden. Abschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (s. 2.6.3) gefärbt.

TAE-Stammlösung (50 x) [Sambrook et al., 2001]: pH 7,5 (mit HCl eingestellt)

Tris	242 g	2 M
Essigsäure 96 % (v/v)	57 ml	1 M
EDTA	14,6 g	50 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

DNA-Ladepuffer (6 x): pH 7,6 (mit HCl eingestellt)

Tris	0,12 g	10 mM
Glycerin	60 ml	8,2 M
EDTA	1,75 g	60 mM
Bromphenolblau	30 mg	434 µM
Xylencyanol FF	30 mg	557 µM
H ₂ O	ad 100 ml	

Daneben konnte auch gebrauchsfertiger Ladepuffer von Fermentas GmbH verwendet werden.

RNA-Auftragspuffer (5 x):

Bromphenolblau	5 mg	723 µM
0,5 M EDTA-Lösung	80 µl	4 mM
Formaldehydlösung (37 % (v/v))	720 µl	727 mM
Formamid (deionisiert)	3,2 ml	8 M
MAE-Puffer (10 x)	4 ml	40 % (v/v)
EtBr (10 mg/ml)	100 µl	254 µM
Glycerin	2 ml	2,7 M
H ₂ O	ad 10 ml	

MAE-Puffer (10 x): pH 7,0

MOPS	41,8 g	200 mM
Na-Acetat	4,1 g	50 mM
EDTA	1,45 g	5 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.6.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.6.2.1 Elektrophoretische Trennung nicht-radioaktiver Sequenzier- und „primer extension“-Reaktionen

Nicht-radioaktive Sequenzier- und „primer extension“-Reaktionen (s. 2.8.5 und 2.10.1.1) wurden auf ein 41 cm langes Polyacrylamid-Gel (6 %, w/v) aufgetragen und in dem automatischen Sequenziergerät LICOR® 4000L aufgetrennt.

Das hierfür nötige Gel wurde gleich nach Zugabe des Polymerisationsstarters vorsichtig mit einer 50-ml-Spritze zwischen zwei waagrecht liegende Glasscheiben, die durch 0,25 mm „spacer“ getrennt und an den Seiten mit langen Leisten handfest fixiert waren, gegossen. Hier war darauf zu achten, dass die Glasplatten vorher äußerst sorgfältig mit Isopropanol gesäubert worden waren und beim Gießen keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Beides war für einen problemlosen Sequenziervorgang von höchster Wichtigkeit. In das noch flüssige Gel wurde im waagerechten Zustand der Vorkamm eingebracht und mit Klammern fixiert. Das Gel sollte mind. 1 h polymerisieren, bevor der Vorkamm durch den „Haifischzahnkamm“ (erzeugt 48 Geltaschen) ersetzt werden konnte.

Nun erfolgte der sog. Vorlauf des unbeladenen Gels in dem Sequenziergerät. Dafür wurde das Gel vertikal eingespannt und der obere und untere Puffertank mit jeweils ca. 0,5 l 1 x TBE-Puffer befüllt. Die Äquilibration, d.h. die Anpassung des Gels an die nötigen Sequenzierparameter (Temperatur: ca. 50 °C, Spannung: 1500 V, Leistung: 31,5 W, Stromstärke: 35 mA), erfolgte für ca. 1 h. Anschließend wurden die Taschen gut gespült, bevor das Gel mit 0,8-1,2 µl der vorher für 5 min bei 95 °C denaturierten Sequenzier- bzw. „primer extension“-Reaktionen beladen werden konnte. Der Gellauf erfolgte meist über Nacht. Nach 8-12 h konnte die Auswertung der gesammelten Daten mit dem Computerprogramm BaseImagIR (Version 2.3; MWG Biotech AG, Ebersberg) durchgeführt werden.

Sequenzier-Gel (6 %):

SequaGel XR-Acrylamid-Lösung	30 ml
SequaGel XR-Puffer-Lösung	7,5 ml
APS (10 % (w/v))	300 µl

TBE-Puffer (10 x): pH 8,3 (mit HCl eingestellt)

Tris	108 g	890 mM
Borsäure	55 g	890 mM
EDTA	9,3 g	32 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.6.2.2 Elektrophoretische Trennung radioaktiver Sequenzier- und „primer extension“-Reaktionen

Für die Auftrennung von radioaktiv-markierten Sequenzier- und „primer extension“-Reaktionen (s. 2.8.6 und 2.10.1.2) wurde die S2 Sequenzierapparatur verwendet. Bei der gesamten Prozedur, d.h. bei dem Zusammenbau der Gelgießapparatur, der Herstellung und dem Gießen der Gellösung und des Gellaufs muss strikt nach Angaben des Herstellers verfahren werden, da anderenfalls große Probleme z. B. beim Beladen des Gels auftreten können.

Nach gründlichem Säubern der Glasplatten mit Isopropanol konnten sie zusammen mit speziellen Abstandshaltern („spacer“) nach Anleitung des Herstellers in einem Gummirahmen fixiert werden. Die Gellösung wurde nach Zugabe des Polymerisationsstarters sogleich vorsichtig mit einer 100-ml-Vollpipette zwischen die zwei schräg gehaltenen Glasplatten pipettiert. Mit steigender Gelfront wurde die gesamte Gelgießapparatur mehr und mehr geneigt. Die beiden Vorkämme wurden nur 2-3 mm tief in das noch flüssige Gel gesteckt und mit Klammern fixiert. Das Gel sollte vor Benutzung mind. 1 h polymerisieren. Anschließend konnten die Vorkämme entfernt und gesäubert werden. Die durch die Vorkämme erzeugte Geltasche wurde mit 1 x TBE (s. 2.6.2.1) sorgfältig gespült. Nach dem Einbau der Glasplatten in die Sequenzierapparatur und Befüllen des oberen bzw. unteren Puffertanks mit jeweils ca. 0,5 l 1 x TBE-Puffer wurden die Kämme umgekehrt als „Haifischzahnkämme“ wieder eingesteckt. Dabei musste genau darauf geachtet werden, dass die Kämme die Gelfront gerade

berührten. Nach gründlichem Spülen der Taschen erfolgte nun die „Präelektrophorese“ des unbeladenen Gels für 15-45 min bei 1500 V und 60 W. Anschließend konnten 2-3 µl Probe (vorher bei 80 °C für 2 min denaturiert und auf Eis abgekühlt) in die nochmals gut gespülten Taschen geladen werden. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte mit den Einstellungen am Gerät, die bereits für die „Präelektrophorese“ verwendet worden waren, für ca. 2-2,5 h.

Danach wurde das Gel vorsichtig von der oberen kleineren Glasplatte gelöst und auf ein „Whatman“-Papier übertragen. Mit einer handelsüblichen Frischhaltefolie überdeckt konnte das Gel auf einer Gel Trocknungsanlage unter Vakuum bei 70 °C für ca. 30 min getrocknet und anschließend in eine Exponierkassette („Hypercassette™“) gelegt werden. In einer Dunkelkammer erfolgte die Exposition auf einen „Hyperfilm™ MP“-Film. Nach durchschnittlich 24 h konnte der Film entwickelt und ausgewertet werden. Bei sehr schwachen Signalen konnte die Exposition auch auf 2-3 Tage verlängert werden.

Sequenzier-Gel:

Harnstoff	42,06 g
TBE-Puffer (10 x)	10 ml
Rotiphorese® Gel 40 ¹⁵	15 ml
TEMED	50 µl
APS (10 % (w/v))	500 µl
H ₂ O	ad 100 ml

Der Harnstoff wurde zuerst auf einem beheizbaren Magnetrührer mit ca. 50 ml H₂O gelöst und erst anschließend die übrigen Komponenten (bis auf TEMED und APS) hinzugefügt. Nachdem die Lösung durch einen Papierfilter filtriert worden war, konnten auch TEMED und APS zugesetzt und die fertige Lösung zügig verwendet werden.

2.6.3 Färben von Nukleinsäuren in Gelen

Zur Visualisierung von Nukleinsäuren wurden die Agarose-Gele 5-10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml in 1 x TAE-Puffer (s. 2.6.1)) gefärbt. Auf einem UV-Transilluminator waren die Nukleinsäure-Banden dann unter UV-Licht (265 nm) sichtbar und konnten mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage fotografiert und digitalisiert werden.

¹⁵: 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1

2.6.4 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurden je nach erwarteter Größe des gewünschten Fragments die gebrauchsfertigen Größenstandards „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ bzw. „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ neben den zu bestimmenden Proben auf das Gel aufgetragen.

Zur Größenbestimmung von RNA wurde der Standard „RNA Ladder, High Range“ verwendet.

2.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.7.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen zu präparativen und analytischen Zwecken erfolgte immer in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer, um möglichst die optimale Aktivität des Enzyms gewährleisten zu können. Bei einem Restriktionsverdau mit zwei oder mehr Enzymen musste ein Puffer gewählt werden, in dem möglichst alle Enzyme 50-100 % Aktivität zeigen. An definierten, für jedes Enzym spezifischen Erkennungssequenzen wird die doppelsträngige DNA dann hydrolysiert. Bei dem analytischen Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten war zu beachten, dass Enzyme meist einen 5-8 Bp-Nukleotidüberhang benötigen, um die DNA korrekt und effizient zu schneiden. Bei der Herstellung dieser PCR-Fragmente wurde deshalb auf solch einen Überhang geachtet und das Einbringen von Restriktionsschnittstellen ganz am Ende des Fragments möglichst vermieden (s. 2.8.2).

Der Restriktionsverdau erfolgte meist in einem 20-200 µl Ansatz, wobei pro µg zu verdauender DNA 1-10 U Enzym eingesetzt und bei vom Hersteller empfohlener Temperatur inkubiert wurde. Analytische Restriktionsansätze wurden im allgemeinen 60 min bei 37 °C inkubiert.

Zur Inaktivierung der Enzyme in präparativen Restriktionsspaltungen wurde nach dem Restriktionsverdau eine Hitzebehandlung (meist 65 °C¹⁶, 10-20 min) durchgeführt. Hitzestabile Enzyme wurden durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.5.1) oder Aufreinigung mit dem „UltraClean™15 DNA Purification Kit“ (s. 2.5.6) aus dem Ansatz entfernt.

¹⁶: Enzymabhängig

Der Restriktionsverdau wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.6.1) überprüft.

2.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen trägt das 5'-Ende der gespaltenen DNA eine Phosphatgruppe. Um restriktionsverdaute Vektor-DNA an einer Religation zu hindern, wurde die Methode der Dephosphorylierung herangezogen. Für die Hydrolyse des Phosphatrests am 5'-Ende des DNA-Fragments wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Enzyme verwendet.

Die SAP („Shrimp Alkaline Phosphatase“) konnte aufgrund ihres großen Aktivitätsbereiches direkt nach dem Verdau zum Restriktionsansatz gegeben werden. Im Normalfall wurden zu 50 µl Restriktionsansatz 2,5 U SAP¹⁷ pipettiert. Der Ansatz wurde anschließend für 45 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym daraufhin für 15 min bei 65 °C inaktiviert.

Die AP („Antarctic Phosphatase“) braucht für ihre optimale Aktivität einen mitgelieferten 10 x „Antarctic Phosphatase“-Puffer. Zu einem 50 µl Restriktionsansatz wurden 5,5 µl 10 x „Antarctic Phosphatase“-Puffer und 5 U¹⁸ AP pipettiert und der Ansatz dann für 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym konnte durch eine Hitzebehandlung bei 65 °C für 5 min inaktiviert werden.

Die Aufreinigung der dephosphorylierten DNA erfolgte aus dem Agarose-Gel durch Ausschneiden der gewünschten Vektorbande (s. 2.5.7) oder über Mikrokonzentratorsäulen (s. 2.5.8).

2.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines dephosphorylierten Vektors mit einem gewünschten DNA-Fragment („insert“) umfasste der Ligationsansatz üblicherweise ein Volumen von 20 µl. Vektor- und „insert“-DNA wurden dabei stets in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Nach Zugabe von 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 1-2 U T4-DNA-Ligase wurde der Ansatz normalerweise 1 h bei 22 °C inkubiert. Je nach Vektor und „insert“-DNA wurden die Proben gegebenenfalls über Nacht bei 16 °C oder 10 min bei RT auf der Laborbank inkubiert. Auch eine sog. Gradienten-Ligation wurde gelegentlich durchgeführt. Hierbei wurde das Reaktionsgefäß mit dem Ligationsansatz in einer Schwimmhilfe in ein 2 bis 3-l-Gefäß gegeben, das mit demin. H₂O (RT) gefüllt war. Das Gefäß wurde über Nacht bei 4 °C im

17: Nach Herstellerangaben empfohlen: 1 U pro Picomol an DNA-5'-Termini (entspricht ca. 1 µg eines linearen 3-kB-DNA-Fragments)

18: Nach Herstellerangaben empfohlen: 5 U pro µg DNA

Kühlraum inkubiert, wodurch das Wasser und somit auch der Ligationsansatz langsam von 20 °C auf 4 °C abgekühlt wurde.

Nach einer Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65 °C für 10 min wurde der Ligationsansatz vollständig in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue- bzw. XL2-Blue-Zellen (s. 2.9.1) transformiert.

2.7.4 TA-Klonierung von PCR-Produkten

Bei schwierigen Klonierungen oder bei geringer PCR-Effizienz war es vorteilhaft, das PCR-Produkt ohne Restriktionsverdau direkt in einen der kommerziell erhältlichen, linearisierten Vektoren pDRIVE® oder pCR®2.1-TOPO® zu klonieren. Auch zeigen einige Restriktionsenzyme geringe Aktivität an Enden von durch PCR erzeugten DNA-Fragmenten, was zu einem unvollständigen Restriktionsverdau und damit zu reduzierter Klonierungseffizienz führen kann. Bei einem TA-klonierten PCR-Produkt ist diese Problematik nicht gegeben.

Die oben genannten Vektoren besitzen an den 3'-Enden ungepaarte Thymidinnukleotide. Durch *Taq*-Polymerase erzeugte DNA-Fragmente tragen an den 5'-Enden überhängende Adenin-Nukleotide und können deshalb direkt in diese Plasmide ligiert werden. Der Erfolg der Ligation kann zusätzlich über eine Blau-Weiß-Selektion (s. 2.9.3) überprüft werden.

Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben mit ca. 100 ng PCR-Produkt und die Transformation erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue- bzw. XL2-Blue-Zellen (s. 2.9.1).

2.8 PCR-Techniken

2.8.1 Standard-PCR

Die in den frühen 80er Jahren von Kary B. Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion stellt eine schnelle und äußerst effiziente Möglichkeit zur Amplifikation von Nukleinsäure-Fragmenten dar [Saiki et al., 1985]. Sie wurde zur präparativen Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen sowie zum analytischen Nachweis von Genen und Plasmiden in Klonen von *E. coli* bzw. *C. acetobutylicum* verwendet.

Hierzu wurden zwei Oligodesoxynukleotide (kurz Oligonukleotide oder „primer“) benötigt, die von den Firmen MWG Biotech AG, Ebersberg oder Biomers.net GmbH, Ulm

synthetisiert wurden. Diese waren im Normalfall 20-25 Bp lang und jeweils komplementär zu einem der beiden 3'-Einzelstrangenden des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges. Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert. Im zweiten Schritt können dann die „primer“ bei einer definierten Temperatur an die einzelsträngige DNA, entsprechend ihrer Sequenzhomologie, hybridisieren. An diesen kurzen, doppelsträngigen Abschnitten kann die DNA-Polymerase im dritten Schritt ansetzen und mit den im Ansatz enthaltenden vier Desoxynukleosidtriphosphaten die „primer“ in 3'-Richtung verlängern. Anschließend wird erneut denaturiert und der Zyklus wird wiederholt. Bei einer Anzahl von n Zyklen können so im Idealfall 2^n Kopien der von den Oligonukleotiden eingerahmten Sequenz erhalten werden.

Die Sequenz der „primer“ wurde, wenn möglich, nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- Schmelztemperatur (T_m) von $55 \pm 8^\circ\text{C}$
- G oder C am 3'-Ende, um bei der Hybridisierung am Punkt der Initiation der Elongation durch die DNA-Polymerase ein stabileres Anheften der Oligonukleotide an den Matrizenstrang zu ermöglichen
- möglichst geringe Wiederholung gleicher Basen
- Vermeidung von Sequenzen, die zu einer internen Sekundärstrukturbildung führen könnten

Bei der Konstruktion und Wahl der „primer“ wurde das Computerprogramm „Clone Manager Suite 7“ (Sci Ed Software; Cary, USA) herangezogen.

Je nach Vorhaben wurden unterschiedliche Polymerasen in den entsprechenden Reaktionen eingesetzt.

Für eine Standard-PCR zum Nachweis von Genen oder Plasmiden wurde die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die im Anschluss kloniert werden sollten, kamen die „PowerScript Short DNA Polymerase“ (Bestandteil des PAN-Enzym-Mixes) oder der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ zum Einsatz. Der Unterschied zur normalen *Taq*-DNA-Polymerase besteht in einer zusätzlichen 3'→5' Exonukleaseaktivität („proof reading“) und dadurch in einer ca. 20 x niedrigeren Fehlerrate bei der Amplifikation.

Ebenfalls Verwendung fanden die „Ready-to-Go PureTaq™ PCR-Beads“. Hier liegen MgCl_2 , dNTPs sowie die *Taq*-Polymerase als lyophilisiertes Kügelchen gebrauchsfertig in einem Reaktionsgefäß vor. Zu diesem muss nur noch die Matrizen-DNA sowie das entsprechende

Oligonukleotid-Paar zugegeben und mit Wasser auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt werden. Nach Auflösen des Kügelchens kann die PCR gestartet werden.

Die Amplifikation erfolgte in Reaktionsgefäßen von 0,2 oder 0,5 ml Volumen mit 25 bzw. 100 µl Versuchsansatz.

Ein PCR-Ansatz für die Amplifikation mit der *Taq*-Polymerase enthielt standardmäßig:

Matrizen-DNA ¹⁹	x µl	
Reaktionspuffer (10 x)	5 µl	1 x
MgCl ₂ [25 mM]	2,5 µl	1,25 mM
dNTP-Gemisch [10 mM]	2 µl	400 µM
Oligodesoxynukleotid 1 [100 pmol/µl]	1 µl	2 µM
Oligodesoxynukleotid 2 [100 pmol/µl]	1 µl	2 µM
<i>Taq</i> -Polymerase [1 U/µl bzw. 5 U/µl]	1-2 µl	1-5 U
H ₂ O	ad 50 µl	

Ein PCR-Ansatz mit einer der oben genannten „proof reading“-Polymerasen war nach Herstellerangaben zusammenzusetzen.

Die Ansätze wurden komplett zusammenpipettiert und anschließend zur Amplifikation der PCR-Fragmente in den Peltier Thermal Cycler PTC-200 gestellt.

Folgendes PCR-Programm wurde standardmäßig verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
2. Denaturierung	30 s	95 °C
3. Hybridisierung	30-45 s	T _m – 5 °C
4. Elongation	60 s/1000 Bp	72 °C
5. Wiederholung der Schritte 2.-4.		
6. Elongation	3 min	72 °C
7. Kühlung	18-24 h	12 °C

19: Als Matrize wurden 10 bis 50 ng Plasmid-DNA bzw. 0,5 bis 1 µg chromosomale DNA eingesetzt.

Bei ungenügender Effizienz und/oder Spezifität wurde der PCR-Ansatz durch eine Änderung der Hybridisierungstemperatur sowie eine Variation der Mg^{2+} -Konzentration optimiert.

2.8.2 Einfügen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR

Um PCR-Fragmente leichter in einer gerichteten oder ungerichteten Klonierung einsetzen zu können, wurden bei der Amplifikation über spezielle „primer“ Erkennungssequenzen für ausgesuchte Restriktionsenzyme eingefügt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide mit einer durchschnittlichen Länge von 25 Nukleotiden waren am 3'- und am 5'-Ende komplementär mit der Matrizen-DNA und in der Mitte erfolgte das Einfügen der für die Restriktionsschnittstelle nötigen Nukleotide. In seltenen Fällen wurde die Schnittstelle auch am 5'-Ende eingefügt. Um einen effektiven Restriktionsverdau zu gewährleisten, wurde am 5'-Ende vor der Schnittstelle noch ein Überhang von ≥ 2 Nukleotiden eingefügt. Die Amplifikation erfolgte analog der Standard-PCR (s. 2.8.1).

2.8.3 SOE-PCR

Um in einem DNA-Abschnitt gezielt Basen zu substituieren, wurde die Methode der „splicing by overlap extension“-PCR [Ho et al., 1989] angewandt.

An einer DNA-Matrize wurden zwei Standard-PCR-Ansätze mit „Ready-to-Go PureTaq™ PCR-Beads“ durchgeführt. In jeder der beiden Reaktionen wurden je ein äußerer und ein innerer „primer“ eingesetzt. Die jeweiligen inneren Oligonukleotide der beiden PCR-Reaktionen waren komplementär zueinander und beinhalteten die zum Original veränderten Basen in ihrer Mitte. Nach anschließender Aufreinigung der erhaltenen PCR-Fragmente 1 und 2 aus dem Agarose-Gel (s. 2.5.7) bzw. über Mikrokonzentratorsäulen (s. 2.5.8), wurden diese dann in einem dritten Standard-PCR-Ansatz mit Hilfe der „PowerScript Short DNA Polymerase“ fusioniert. Die beiden Fragmente, die aufgrund der Hitzedenaturierung aufschmolzen, konnten durch die überlappenden Bereiche miteinander hybridisieren. Die zueinander komplementären Enden der Einzelstränge dienten als „primer“ zum Auffüllen des Doppelstrangs (10 Zyklen). Nach Zugabe der äußeren Oligonukleotide wurde das mutagenisierte Fusionsprodukt weiter amplifiziert.

Folgendes PCR-Programm wurde für die Fusion von Fragment 1 und Fragment 2 verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
2. Denaturierung	30 s	95 °C
3. Hybridisierung	25 s	55 °C – 1 °C pro Zyklus
4. Elongation	60 s/1000 Bp	72 °C
5. Wiederholung der Schritte 2.-4.; 10 Zyklen		
6. Pause	Zugabe der beiden äußeren „primer“ bei 4 °C	
7. Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
8. Denaturierung	30 s	95 °C
9. Hybridisierung	45 s	55 °C
10. Elongation	60 s/1000 Bp	72 °C
11. Wiederholung der Schritte 8.-10.; 24 Zyklen		
12. Elongation	3 min	72 °C
13. Kühlung	18-24 h	12 °C

Das gewünschte PCR-Produkt wurde aus dem Agarose-Gel (s. 2.5.7) aufgereinigt.

2.8.4 RT-PCR

Für den Nachweis eines RNA-Transkripts wurde die Methode der „reverse transcription polymerase chain reaction“ (RT-PCR) angewandt. Hierbei werden RNA-Moleküle vervielfältigt, indem zunächst die RNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und durch Zugabe von entsprechenden „primer“ und einer DNA-Polymerase dann ein spezifisches Produkt amplifiziert wird. Ein Amplifikat wird demnach nur erhalten, wenn die entsprechende mRNA eines Gens oder eines Operons im Zuge der Transkription gebildet wurde.

Pro RT-PCR-Ansatz wurden zuerst zusammengegeben:

RNA	x μl	0,01-0,5 μg
rückwärts-„primer“ [20 μM]	1,5 μl	2,7 μM
RNase freies Wasser	ad 11 μl	

Die Ansätze wurden für 5 min bei 70 °C in der PCR-Maschine inkubiert und anschließend schnell auf 4 °C abgekühlt.

Nach Zugabe von:

RT-Reaktionspuffer (5 x)	4 μl	1 x ²⁰
dNTP-Gemisch [10 mM]	2 μl	1 mM
RNase Inhibitor „Ribolock™“ [40 U/ μl]	1 μl	40 U

wurden die Proben 5 min bei 37 °C inkubiert, bevor 2 μl (entsprechen 40 U) der Reversen Transkriptase des „Moloney Murine Leukemia“ Virus (M-MuLV) zugegeben wurden. Für eine Negativkontrolle wurden entsprechend 2 μl Wasser dazu pipettiert. Anschließend wurden die Ansätze für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Nach Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C für 10 min schloss sich eine Standard- PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (s. 2.8.1) an.

Pro Ansatz wurden in diese PCR eingesetzt:

<i>Taq</i> -Polymerase [1 U/ μl]	5 μl	5 U
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Reaktionspuffer (10 x)	5 μl	1 x
MgCl ₂ [25 mM]	2,5 μl	1,25 mM
Vorwärts-„primer“ [20 μM]	1,5 μl	0,6 μM
H ₂ O	ad 50 μl	

Ebenso konnten für diese PCR auch „Ready-to-Go PureTaq™ PCR-Beads“ verwendet werden (s. 2.8.1).

20: 1fach konzentriert erst nach Zugabe von 2 μl RT-Enzym!

Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Proben auf DNA-Kontaminationen wurde parallel ein Ansatz mit „Ready-to-Go PureTaq™ PCR-Beads“ (s. 2.8.1) durchgeführt.

Die DNA-Fragmente wurden in einer nicht-denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.6.1) und ihre Größen wie in 2.6.4 beschrieben bestimmt.

2.8.5 Nicht-radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die nicht-radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem automatischen Sequenziergerät Li-COR® 4000L. 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.

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Methode nach Sanger et al. (1977), bei der in vier unterschiedlichen Ansätzen jeweils eine geringe Menge an Didesoxynukleotiden (ddNTP; A,C,T oder G) zu dem PCR-Ansatz zugegeben wird. Nach Einbau eines ddNTPs kommt es zum Abbruch der Reaktion, da aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3'-Ende kein weiteres Nukleotid mehr an die Kette durch die Polymerase kondensiert werden kann. Der einzige Unterschied zu einer normalen PCR besteht darin, dass nur ein Oligonukleotid in der Reaktion Verwendung findet („cycle sequencing“) [Saluz und Jost, 1989].

Für die nicht-radioaktive Sequenzierung wurde der „SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ Sequencing Kit-LC“ verwendet. Bezüglich der Ansätze für die einzelnen Sequenzierreaktionen wie auch hinsichtlich der sonstigen Durchführung wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren. Die Komponenten wurden mit 2 pmol IRD800-markiertem Oligonukleotid und 150-250 fmol Matrizen-DNA pro „master mix“ für die vier Reaktionsansätze (mit je einem Dideoxynukleotid) gemischt.

Das folgende PCR-Programm wurde für eine Standard-Sequenzierreaktion benutzt:

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
2. Denaturierung	30 s	95 °C
3. Hybridisierung	30-45 s	$T_m - 5\text{ °C}$
4. Elongation	60 s/1000 Bp	72 °C
5. Wiederholung der Schritte 2.-4. für 30 Zyklen		
6. Elongation	3 min	72 °C
7. Kühlung	18-24 h	12 °C

Nach der PCR wurden jedem Ansatz 3 µl Stopp-/Lade-Puffer zugegeben. Jeweils 1 µl der einzelnen Sequenzierreaktionen wurden auf ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel (s. 2.6.2.1) neben die Proben aus 2.10.1.1 aufgetragen. Zuvor erfolgte die Denaturierung der Reaktionsansätze für 5 Minuten bei 95 °C. Für eine spätere Verwendung wurden die Proben lichtgeschützt verpackt und bei -20 °C eingefroren.

Die Aufnahme der Daten erfolgte mit dem Programm „Base ImagIR Data Collection“, die Auswertung mit dem Programm „Base ImagIR Image Analysis (Vers. 2.3)“.

2.8.6 Sequenzieren von Plasmid-DNA mit radioaktiver Markierung

Um bei der radioaktiven Durchführung einer „primer extension“-Analyse (s. 2.10.1.2) eine entsprechende Sequenzierreaktion auftragen zu können, wurde diese mit radioaktiver Markierung und einem Plasmid des entsprechenden Genbereichs (über TA-Klonierung beispielsweise im pUC18, pDRIVE®, pCR®2.1-TOPO®) sowie dem gleichen bei der „primer extension“-Analyse verwendeten Oligonukleotid durchgeführt. Hierfür wurde „Procedure C: Standard Annealing of Primer to doublestranded Template“ des „T7 Sequencing Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei 2 µg DNA des zu sequenzierenden Plasmids und 10 pmol „primer“ eingesetzt wurden. Außerdem wurden 10 µCi [α -³²P]-ATP für die „Read Short“-Sequenzierreaktion verwendet.

Nachdem die Reaktionsansätze für 2 min bei 80 °C denaturiert worden waren, konnten jeweils 2-3 µl auf ein 6%iges Polyacrylamidgel (s. 2.6.2.2) neben die Proben aus 2.10.1.2 aufgetragen werden.

Für eine spätere Verwendung konnten die Proben auch unter Berücksichtigung der Halbwertszeit von $^{32}\text{P}^{(21)}$ bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.8.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA und Sequenzanalysen

Um die selbst konstruierten bzw. klonierten Konstrukte zu überprüfen, erfolgte das Sequenzieren der entsprechenden Plasmid-DNA. So konnte festgestellt werden, ob es bei der Amplifikation eines anschließend klonierten DNA-Bereichs zu Mutationen gekommen war. Sämtliche Sequenzierungen wurden hierbei von den Firmen MWG Biotech AG (Ebersberg) oder AGOWA Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH (Berlin) durchgeführt.

Die Analyse von Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Clone Manager Suite 7“ (Sci Ed Software; Cary, USA).

2.9 DNA-Transfer in Bakterien

2.9.1 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* -Zellen und deren Transformation mit Ligationsansätzen wurde nach einer modifizierten Methode von Inoue et al. (1990) durchgeführt.

2.9.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Bei dieser Methode wurden 250 ml SOB-Medium mit 3-5 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli*-Vorkultur am späten Nachmittag angeimpft. Die SOB-Kultur wurde dann über Nacht bei $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation ($4000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 80 ml eiskaltem PIPES-Puffer gewaschen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ($4000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) konnte das Sediment in 20 ml eiskaltem PIPES-Puffer suspendiert und mit 1,5 ml DMSO (entspricht einer Endkonzentration von 7 %, v/v) versetzt werden. Hierbei war darauf zu achten, dass das DMSO sehr langsam zu getropft wurde, um ein Ausfallen zu vermeiden. Die Zellen wurden in 200- μl -Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

21: Ca. 14 Tage

PIPES-Puffer:

Komponente 1:

PIPES (pH 6,7)	756 mg	10 mM ²²
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	551,4 mg	15 mM ²²
H ₂ O	ad 125 ml	

Komponente 2:

KCl	4,66 g	250 mM ²²
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	2,8 g	55 mM ²²
H ₂ O	ad 125 ml	

Beide Komponenten des Puffers werden getrennt autoklaviert und erst nach dem Abkühlen zusammen gegeben.

2.9.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Der Vorteil dieser Methode ist, dass weder eine zu hohe Salzkonzentration noch eine zu hohe Plasmidmenge die Transformationseffizienz beeinflusst.

Zur Transformation wurden die Eppendorfreaktionsgefäße mit den 200 µl chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit dem zu transformierenden Plasmid (100-400 ng) bzw. 20 µl Ligationsansatz versetzt. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min und eine Abkühlung auf Eis für 2,5 min. Die so transformierten Zellen konnten sich nach Zugabe von 0,8 ml vorgewärmtem (42 °C) SOC-Medium bei 37 °C für 45-60 min regenerieren. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 * g und RT für 1 min sedimentiert, 800 µl des Überstandes verworfen und das Sediment in dem restlichen Medium suspendiert. Jeweils 50-100 µl Zellsuspension wurden auf vorgewärmte Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert.

2.9.2 Elektrotransformation von *E. coli*

Die Herstellung elektrokompeter *E. coli*-Zellen und deren Transformation mit Plasmiden wurde nach einer modifizierten Methode von Dower et al. (1988) durchgeführt.

22: Die molaren Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration im Puffer nach Zusammengeben der beiden Komponenten.

2.9.2.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Aus einer frischen, über Nacht gewachsenen *E. coli*-Kultur wurden 250 ml LB-Medium mit 1-2 % (v/v) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 schüttelnd bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden dann 15-30 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4 °C geerntet (6000 * g, 10 min). Alle weiteren Schritte der Präparation nach der Ernte der Zellen wurden auf Eis und mit eiskalten Lösungen durchgeführt. Um die Zellen für die salzempfindliche Elektrottransformation von Ionen zu befreien, wurden die Zellen zweimal, zuerst mit 1 Vol., dann mit 0,5 Vol. 4 °C kaltem Wasser gewaschen. Das daraus resultierende Sediment wurde wiederum zweimal mit 4 °C kaltem Glycerin (10 % (v/v); 1. Waschschrift: 0,2 Vol., 2. Waschschrift: 0,1 Vol.) gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte dabei jeweils für 10 min bei 6000 * g und einer Temperatur von 4 °C. Abschließend wurde 1 ml einer 10%igen (v/v), 4 °C kalten Glycerin-Lösung zugegeben. Nachdem 50-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, konnten diese mehrere Monate bei -70 °C aufbewahrt werden.

2.9.2.2 Elektroporation von *E. coli*

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen zunächst auf Eis aufgetaut, dann mit 100-400 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine sterile, eisgekühlte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm überführt. Die dabei eingesetzte DNA-Lösung sollte möglichst salzfrei sein, um einen Spannungsüberschlag zwischen den Elektroden während der Elektroporation zu verhindern.

Die Transformation erfolgte mit Hilfe eines Gene Pulser-II mit Pulse Controller Plus, der den nötigen Strompuls von 2,5 kV bei 25 µF und 200 Ω erzeugte. Die daraus resultierende Zeitkonstante lag bei ca. 4,5-5 ms. Sofort nach dem Strompuls wurden die Zellen zur Regeneration mit 800 µl SOC-Medium versetzt, in Eppendorfgefäße überführt und 45-60 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Jeweils 50-200 µl Zellsuspension wurden auf vorgewärmte Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert.

2.9.3 X-Gal-Färbung zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Durch eine chromosomal lokalisierte Deletion (*laqI*^qZΔM15, [Vieira und Messing, 1982]) war es den verwendeten *E. coli*-Stämmen nicht möglich, eine funktionsfähige β-Galaktosidase zu bilden. Dieser Defekt konnte durch einen plasmidkodierten Genort (*lacPOZ'*) ausgeglichen werden. Diese räumliche Trennung war die Grundlage einer Selektion, die die Replikation des gesuchten Plasmids voraussetzt. War dieser Genort (*lacPOZ'*) in der MKS des transformierten Vektors (z. B. pUC18, pDRIVE®, pCR®2.1-TOPO®) lokalisiert, so konnte ein inserierendes

Fragment dieses Gen inaktivieren, wodurch keine funktionierende β -Galaktosidase mehr entstehen konnte. Durch das Substratanalogon X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid), das hydrolysiert durch die β -Galaktosidase mit Sauerstoff einen blauen Farbstoff ausbildet, konnten Kolonien, die weiß blieben, als diejenigen identifiziert werden, die keine funktionsfähige β -Galaktosidase mehr hatten und somit Plasmide besaßen, die ein „insert“ trugen. Eine ständige Derepression des *lacPOZ* wurde durch den Induktor IPTG gewährleistet. Zur Ausführung des Tests wurden X-Gal- und IPTG-Lösung, wie in 2.2.1.11 beschrieben, auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert und getrocknet. Die Voraussetzung war in jedem Falle eine Anzucht auf Selektiv-Agarplatten, die sicherstellte, dass nahezu alle Kolonien Plasmide trugen.

2.9.4 Elektrotransformation von *C. acetobutylicum*

2.9.4.1 Herstellung elektrokompenter *C. acetobutylicum*-Zellen

Nachdem 5 ml CGM mit einer vorher pasteurisierten Sporensuspension des Wildtyps von *C. acetobutylicum* angeimpft (s. 2.2.2.1) und über Nacht bei 37 °C inkubiert worden waren, wurde die Kultur am nächsten Morgen in einer Zentrifuge für Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc.; Vineland; USA) abzentrifugiert (3000 * g, 10 min, 4 °C). 4 ml des Überstandes wurden mit einer sterilen Spritze abgenommen und das Zellsediment in dem restlichen Medium gelöst. Mit dieser Zellsuspension wurden nun 50 ml vorgewärmtes CGM beimpft und ca. 3-4 h bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultiviert. Die Kultur sollte sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und „leichtes Perlen“ sowie eine „feine und stabile Schaumkrone“ aufweisen. Nach Entgasen der Kulturflasche mit einer sterilen Kanüle wurde diese zusammen mit allen anderen für die Transformation nötigen Utensilien in die Anaerobenkammer eingeschleust. Alle folgenden Schritte wurden ebenfalls in der Kammer durchgeführt. Die Kultur wurde bei 2200 * g für 10 min und 4 °C abzentrifugiert und anschließend einmal mit 1 Vol. 4 °C kaltem ETM-Puffer gewaschen (2200 * g, 10 min, 4 °C). Der Überstand sollte möglichst vollständig abgenommen werden, bevor das Sediment in 3 ml eiskaltem ET-Puffer (ET-Puffer entspricht dem ETM-Puffer ohne MgCl₂) suspendiert wurde. Die auf diese Weise hergestellten kompetenten Zellen waren für 5 Transformationsansätze ausreichend. Bis zur gleich anschließenden Transformation wurde die Zellsuspension auf Eis gestellt.

ETM-Puffer: pH 6

Saccharose	92,3 g	270 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	106,6 mg	0,6 mM
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	686,6 mg	4,4 mM
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	2,04 g	10 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.9.4.2 Elektroporation von *C. acetobutylicum*

Für die Elektroporation wurden 600 µl kompetente Zellen zu 1-4 µg Plasmid-DNA, die bereits in entsprechende Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,4 cm) vorgelegt und in diesen bis zur Verwendung auf Eis gekühlt worden waren, gegeben und gemischt. Zur Erzeugung des notwendigen Strompulses kam ein Gene Pulser-II mit Pulse Controller Plus zum Einsatz, wobei folgende Einstellungen gewählt wurden:

Kapazität	50 µF
Spannung	1,8 kV
Widerstand	600 Ω

Die daraus resultierende Zeitkonstante lag bei ca. 12 ms. Sofort nach dem Strompuls wurden die Zellen zu 1,4 ml vorgekühltem (4 °C) CGM gegeben und 4 h bei 37 °C regeneriert. Jeweils 200 µl Zellsuspension wurden auf Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert, mit Parafilm verschlossen und ca. 3-5 Tage bei 37 °C in der Anaerobenkammer inkubiert, bevor eine Sporenpräparation (s. 2.2.2.3) durchgeführt werden konnte.

2.9.4.3 Methylierung von Plasmid-DNA für die Transformation in *C. acetobutylicum*

In *C. acetobutylicum* verhindert ein sequenzspezifisches Restriktionssystem die Etablierung von aus *E. coli* präparierten Vektoren [Mermelstein et al., 1992].

Die Methylierung des internen Cytosin der Basenfolgen 5'-GGCC-3' und 5'-GCNGC-3' mit der Methyltransferase Φ3T [Noyer-Weidner et al., 1985] schützt die Plasmid-DNA vor der Degradierung durch die Restriktionsendonuklease *Cac824I* in *C. acetobutylicum*. Die zur Elektroporation eingesetzten Vektoren wurden deshalb mit der auf den Plasmiden pAN1 [Mermelstein und Papoutsakis, 1993] bzw. pANS1 [Böhringer, 2002] kodierten

Methyltransferase *in vivo* methyliert. Dafür wurden die *E. coli*-Stämme ER2275, SURE™ oder XL1-Blue MRF' verwendet, da sie keines der Restriktionssysteme McrA, McrBC und Mrr besitzen. Diese würden DNA schneiden, bei der das Cytosin der Sequenz 5'-CG-3' methyliert ist. Die Plasmide pAN1 oder pANS1 wurden zunächst in diesen Stämmen etabliert und diese dann mit dem zu methylierenden Plasmid transformiert.

Die so modifizierte Plasmid-DNA wurde durch Mini- oder Midipräparationen (s. 2.4.6.1, 2.4.6.2, 2.4.6.3) aus den *E. coli*-Stämmen isoliert. Die Plasmide pAN1 und pANS1 mussten nicht aus den Plasmid-Präparationen entfernt werden, da sie nicht in *C. acetobutylicum* replizieren.

2.10 Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten

2.10.1 „primer extension“-Analyse

2.10.1.1 „primer extension“-Analyse mit nicht radioaktiver Markierung am LiCor

Um Transkriptionsstartpunkte zu ermitteln, wurde RNA aus *C. acetobutylicum* isoliert (s. 2.4.3) und durch eine Reverse Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde die Methode der „primer extension“-Analyse basierend auf der Vorschrift von Kellmann et al. (1990) angewendet.

Dafür wurde ein IRD800-markiertes Starter-Oligonukleotid, das ca. 100-150 Basen nach vermutetem Transkriptionsstartpunkt im Gen an die mRNA bindet und den cDNA-Strang in 5'-Richtung vervollständigen konnte, verwendet. Die so entstandenen cDNA-Fragmente brachen alle beim Transkriptionsstartpunkt ab und konnten durch Vergleiche mit einer Sequenzreaktion (s. 2.8.5) mit demselben Oligonukleotid in ihrer Länge ermittelt werden.

Für die Anlagerung eines spezifischen IRD800-markierten „primer“ an die mRNA wurde folgender Ansatz gewählt:

„annealing“-Puffer (5 x)	2 µl	1 x
KCl [2 M]	1,25 µl	250 mM
RNase-Inhibitor „RiboLock™“ [40 U/µl]	1 µl	40 U
Oligonukleotid, IRD800-markiert [2 pmol/µl]	1 µl	0,2 µM
Gesamt-RNA ²³	x µl	10 µg
H ₂ O	ad 10 µl	

Um RNA-Sekundärstrukturen zu denaturieren, wurde der Ansatz für 5 min auf 80 °C erhitzt und dann bei 40 °C für 3 h inkubiert.

Anschließend wurde die Synthese des cDNA-Stranges durch Zugabe folgender Komponenten gestartet:

„first-strand buffer“ (5 x) ²⁴	10 µl	1 x
DTT [100 mM] ²⁴	5 µl	10 mM
dNTP-Gemisch [je 5 mM]	5 µl	0,5 mM
Actinomycin D [5 mg/ml in Ethanol]	0,5 µl	2,5 µg
H ₂ O	20 µl	
Reverse Transkriptase ²⁴	1 µl	200 U
„SuperScript™ II RNase H“- [200 U/µl]		

Der Ansatz wurde daraufhin für 1 h bei 40 °C inkubiert. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.5.1), welche ohne anschließende Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol durchgeführt wurde, und daran angeschlossen eine Ethanol-fällung (s. 2.5.2). Das getrocknete Sediment wurde in 2,5 µl H₂O aufgenommen und mit 1,5 µl „Stop-Mix“ aus dem „SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ Sequencing Kit-LC“ versetzt.

23: Evtl. musste das Volumen der RNA-Lösung in der Vakuum-Zentrifuge eingeengt werden, um die nötigen 10 µg in dem vorgegebenen Ansatz einsetzen zu können.

24: Bestandteil des „SuperScript™ II Reverse Transcriptase H“-Systems

Abschließend wurden 1-1,2 µl des Ansatzes auf einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel (s. 2.6.2.1) aufgetrennt. Durch Vergleich mit einer ebenfalls aufgetragenen Sequenzierreaktion (s. 2.8.5) mit dem gleichen Oligonukleotid konnte die Länge der entstandenen cDNA bestimmt bzw. auf das 5'-Ende der mRNA geschlossen werden.

„annealing“-Puffer (5 x): pH 8,3 (mit HCl eingestellt)

Tris	0,6 g	50 mM
KCl	9,3 g	1,25 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

2.10.1.2 „primer extension“-Analyse mit radioaktiver Markierung

2.10.1.2.1 Radioaktive Markierung von Oligodesoxynukleotiden für eine radioaktive „primer extension“-Analyse

Um eine „primer extension“-Analyse mit radioaktiver Markierung durchführen zu können, muss zunächst mit dem dabei verwendeten Oligonukleotid eine radioaktive Markierungsreaktion durchgeführt werden. Mit Hilfe des Enzyms T4 DNA-Polynukleotidkinase (PNK) wird an das 5'-Ende des „primer“ ein Phosphat aus [γ -³²P]-ATP übertragen. Da das 5'-Ende des Oligonukleotids im Gegensatz zu natürlicher DNA nicht phosphoryliert ist, muss an dieser Stelle keine Dephosphorylierung erfolgen.

Ansatz für die radioaktive Markierung des „primer“:

„primer“ [20 pmol/µl]	2 µl	2 µM
PNK-Puffer A (10 x) ²⁵	2 µl	1 x
PEG6000 (24 % (w/v))	4 µl	4,8 % (w/v)
T4 DNA-Polynukleotidkinase [10 U/µl]	2 µl	20 U
[γ - ³² P]-ATP [10 µCi/µl]	4 µl	40 µCi
H ₂ O	ad 20 µl	

Nach der Zugabe der T4 DNA-Polynukleotidkinase (PNK) und [γ -³²P]-ATP im Isotopenlabor wurde der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit „MicroSpin™

25: Gebrauchsfertig von Fermentas GmbH

G-25 Columns“ (s. 2.5.9) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und konnte nun fertig zum Gebrauch unter Berücksichtigung der Halbwertszeit von $^{32}\text{P}^{(26)}$ bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.10.1.2.2 „primer extension“-Reaktion mit radioaktiver Markierung

Analog der nicht radioaktiven Durchführung einer „primer extension“-Analyse wurde zuerst die Hybridisierung des vorher radioaktiv markierten Oligonukleotids an die aus *C. acetobutylicum* isolierte und DNase-behandelte mRNA (s. 2.4.3; 2.4.5) durchgeführt.

Folgender Ansatz wurde gewählt:

Gesamt-RNA ²⁷	x μl	10 μg
radioaktiv markierter „primer“	x μl	3300-8300 Bq
H ₂ O ²⁸	ad 11 μl	

Der Ansatz wurde 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und nach einer kurzen Abkühlung auf Eis zwischen 1,5 und 2 h bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Durch die Zugabe folgender Lösungen wurde die cDNA-Synthesereaktion gestartet:

„first-strand buffer“ (5 x) ²⁹	4 μl	1 x
DTT [100 mM] ²⁹	2 μl	10 mM
dNTP-Gemisch [je 10 mM]	1 μl	0,5 mM
RNase-Inhibitor „RiboLock™“ [40 U/ μl]	1 μl	40 U
Reverse Transkriptase ²⁹	1 μl	200 U
„SuperScript™ II RNase H“- [200 U/ μl]		

Es folgte eine Inkubation für 1 h bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4 μl 1 M NaOH und nach einer 10minütigen Inkubation bei RT durch eine weitere Zugabe von 4 μl 1 M HCl gestoppt. Danach wurde der

26: Ca. 14 Tage

27: Evtl. musste das Volumen der RNA-Lösung in der Vakuum-Zentrifuge eingengt werden, um die nötigen 10 μg in dem vorgegebenen Ansatz einsetzen zu können.

28: DEPC-Wasser, um RNasen zu inhibieren (s. 2.3.1)

29: Bestandteil des „SuperScript™ II Reverse Transcriptase H“-Systems

Ansatz mit 22 µl H₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und damit eine Ethanol-fällung (s. 2.5.2) durchgeführt, wobei dem Reaktionsansatz 5 µl 3 M Na-Acetat-Lösung und 100 µl Ethanol abs. zugefügt wurden. Die Fällung geschah über Nacht. Wie in 2.5.2 beschrieben, schloss sich daran ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol an, bevor das Sediment im geöffneten Reaktionsgefäß bei 37 °C auf dem Heizblock getrocknet wurde. Das Sediment wurde in 6 µl „Stop-Mix“ des „T7 Sequencing Kit“ suspendiert und zur vollständigen Lösung des Sediments weitere 10 min auf den Heizblock gestellt. Nach einer Denaturierung für 2 min bei 80 °C wurden die Proben auf Eis abgekühlt und bis zum Auftragen dort gelagert. Die „primer extension“-Reaktion konnte nun zusammen mit einer entsprechenden Sequenzierreaktion desselben Oligonukleotids (s. 2.8.6) auf ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (s. 2.6.2.2) aufgetragen werden.

Für eine spätere Verwendung der „primer extension“-Reaktionen konnten diese auch unter Berücksichtigung der Halbwertszeit von ³²P⁽³⁰⁾ bei -20 °C gelagert werden.

Es folgte die Elektrophorese in der Sequenzierapparatur, die Trocknung des Gels und die Exposition auf einen „Hyperfilm™ MP“-Film, wie es in 2.6.2.2 beschrieben wurde.

2.10.2 „5'-RACE“

Um Transkriptionsstartpunkte von Genen zu bestimmen, konnte auch die Methode der „5'-RACE“ angewendet werden. Diese stellt eine schnelle und vor allem Radioaktivität-freie Alternative zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes dar. Ein Schema zur Vorgehensweise ist in Abbildung 3 zu sehen.

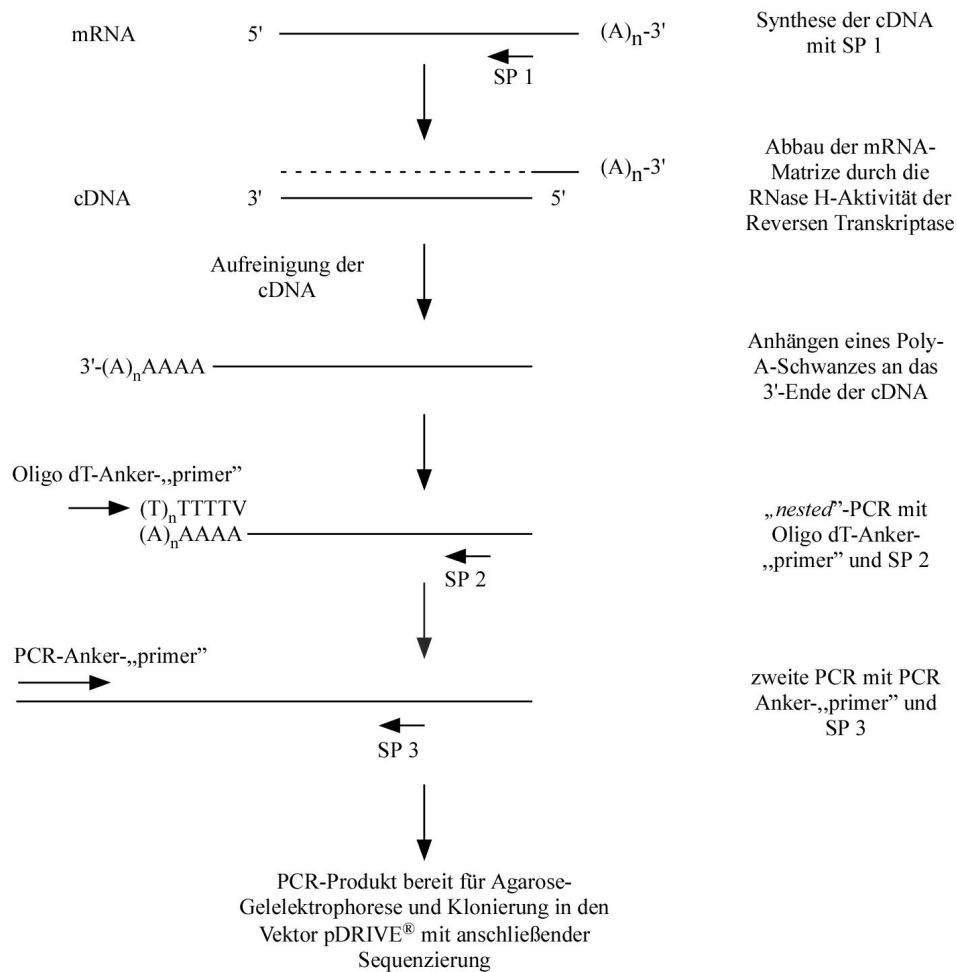


Abbildung 3: Schema der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes eines Gens mittels „5'-RACE“.
 SP 1-3: Sequenz-spezifische Oligonukleotide 1-3. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Wie bei der „primer extension“-Reaktion erfolgte zunächst eine Reverse Transkription der vorher aus *C. acetobutylicum* isolierten und DNase-behandelten mRNA (2.4.3; 2.4.5) mittels eines ersten transkriptionsspezifischen „primer“, der ca. 450 Bp nach dem Translationsstartpunkt im Gen an die mRNA band. Daran schloss sich der Abbau der mRNA-Matrize durch die RNase H-Aktivität der Reversen Transkriptase und die Aufreinigung der synthetisierten cDNA mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“³¹ nach Herstellerangaben an. Die so entstandenen cDNA-Fragmente brachen alle beim Transkriptionsstartpunkt ab. Nach Anhängen eines Poly-A-Schwanzes an das 3'-Ende der

31: Bestandteil des „5'-RACE-Kit“

cDNA mit Hilfe einer Terminalen Transferase wurde die so markierte cDNA in einer „*nested*“-PCR amplifiziert. Dabei wurden der im „5'-RACE-Kit“ mitgelieferte Oligo dT-Anker-„primer“ und ein zweiter, weiter stromaufwärts liegender, transkriptionsspezifischer „primer“ verwendet. Durch eine weitere Amplifikation mit dem PCR-Anker-„primer“ und einem dritten, noch näher am Translationspunkt bindenden Oligonukleotid wurde die gewünschte cDNA ein weiteres mal vervielfältigt.

Anschließend konnte das PCR-Produkt zur Auftrennung einzelner Banden einer nicht-denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese unterzogen werden. Hierbei wurde eine 4%ige Agarosekonzentration gewählt, um eventuell einzelne Fragmente, die sich in ihrer Größe nur um ca. 50 Bp unterschieden, als getrennt wahrnehmen zu können (s. 2.6.1). Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (s. 2.5.7). Nach erfolgreicher Klonierung in den pDRIVE® Vektor (s. 2.7.4), konnte das 3'-Ende des Fragments und somit der Transkriptionsstartpunkt des Gens durch Sequenzierung ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die cDNA-Synthese 3-5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die „*nested*“-PCR und die darauf folgende zweite PCR wurden mit dem PAN-Enzym-Mix (s. 2.8.1) durchgeführt, wobei die cDNA mit dem Poly-A-Schwanz unverdünnt in die „*nested*“-PCR eingesetzt wurde. Ansonsten wurde bei der Durchführung dieser Methode strikt nach Anweisung des Herstellers verfahren.

2.11 „ClosTron® Gene Knockout System“

Das „ClosTron® Gene Knockout System“ stellt eine schnelle, effiziente und sehr spezifische Methode der Geninaktivierung durch eine Integration von sog. Gruppe-II-Introns dar [Frazier et al., 2003]. Dabei erkennt ein induzierbares plasmidkodiertes Gruppe-II-Intron eine spezifische chromosomale Sequenz und inseriert dort autokatalytisch [Zhong et al., 2003]. Eine erst nach einer erfolgreichen Integration aktive Antibiotikaresistenz erlaubt zusätzlich eine effiziente Selektion der Integrationsmutanten.

Die Erkennungssequenz des Introns kann durch eine Ein-Schritt-SOE-PCR (s. 2.11.1) an das Zielgen angepasst werden. Die Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH bietet dafür eine über eine Internetseite (<http://www.sigma-genosys.com/targetron/>) erreichbare Suchfunktion und automatische „primer“-Generierung an.

Da weder der Promoter, der Integrationsmarker noch das Replikon des originalen TargeTron™-Plasmids pACD4K-C in Clostridien funktional ist, wurde der speziell für diese Organismen entwickelte Vektor pMTL007 verwendet. Er enthält u. a. einen IPTG-

induzierbaren *fac*-Promoter, eine modifizierte *ermB*-Resistenzkassette und ein pCB102-basierendes Replikon [Heap et al., 2007].

2.11.1 Ein-Schritt-SOE-PCR

Um die Erkennungssequenz des Introns dahingehend zu mutieren, dass es in ein gewünschtes Zielgen inseriert, wurde das Prinzip der „splicing by overlap extension“-PCR [Ho et al., 1989] angewendet. Jedoch wurden die normalerweise 3 Reaktionsansätze zu einem einzigen Schritt vereint („one-step SOE-PCR“).

Zuerst wurde die Sequenz des Zielgens mit Hilfe eines computergestützten Algorithmus' der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH auf mögliche Insertionsstellen hin durchsucht und für jede ausgewählte Insertionsstelle die „primer“ IBS, EBS2 sowie EBS1d für die Mutation der Erkennungssequenz des Introns generiert. Von der Firma biomers.net GmbH, Ulm wurden diese synthetisiert. Nach Erhalt wurden die „primer“ IBS und EBS1d auf 100 µM und der „primer“ EBS2 auf 20 µM mit H₂O verdünnt.

Die SOE-PCR wurde in Anlehnung an das Handbuch des Herstellers unter Verwendung des „FailSafe™ PCR-Systems“ nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Herstellung des „primer“-Mixes:

IBS (100 µM)	1 µl	10 µM
EBS1d (100 µM)	1 µl	10 µM
EBS2 (20 µM)	1 µl	2 µM
EBS Universal (20 µM) ³²	1 µl	2 µM
H ₂ O	ad 10 µl	

Der Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

„primer“-Mix	1 µl
Intron-Matrize ³³ (zuvor 1:10 verdünnt)	1 µl
Failsafe™ Premix E	25 µl
Failsafe™ Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

32: Im „ClosTron™ Gene Knockout System“ enthalten

33: Im „ClosTron™ Gene Knockout System“ enthalten

Nachstehendes PCR-Programm wurde verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	30 s	95 °C
2. Denaturierung	15 s	95 °C
3. Hybridisierung	30 s	55 °C
4. Elongation	30 s	72 °C
5. Wiederholung der Schritte 2.-4. für 30 Zyklen		
6. Elongation	2 min	72 °C
7. Kühlung	18-24 h	12 °C

Der Erfolg der SOE-PCR wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.6.1) überprüft und das PCR-Produkt anschließend aufgereinigt (s. 2.5.6). Es sollte eine deutliche Bande mit einer Größe von 350 Bp zu sehen sein.

2.11.2 Restriktionsspaltung von DNA-Fragment und Vektor pMTL007

Das in 2.11.1 hergestellte DNA-Fragment wie auch der Vektor pMTL007 wurden einer doppelten Restriktionsspaltung unterzogen, um für eine folgende Ligation kompatible DNA-Enden zu generieren. Dabei wurden ca. 200 ng Insert bzw. 2 µg Vektor in einem 20-µl-Ansatz zusammen mit jeweils 20 U der Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Bsr*GI im entsprechenden Restriktionspuffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das DNA-Fragment konnte danach direkt aufgereinigt (s. 2.5.6) und in die Ligation eingesetzt werden. Der Vektor wurde, wie in 2.7.2 beschrieben, zusätzlich dephosphoryliert. Da außerdem der hier verwendete Vektor schon ein inseriertes DNA-Fragment trug, musste dieses unbedingt vorher durch eine Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.6.1) abgetrennt und der linearisierte, etwa 11,5 kBp große Vektor aus dem Gel aufgereinigt (s. 2.5.7) werden.

2.11.3 Ligation von DNA-Fragment und Vektor pMTL007

Für eine Ligation wurden 100 ng Vektor und 15 ng DNA-Fragment (entspricht einem molaren Verhältnis von 1:5) zusammen mit 10 U T4-DNA-Ligase in einem 20-µl-Ansatz zuerst für 12 h bei 16 °C inkubiert und die Ligase dann für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Der komplette Ansatz wurde in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert (s.

2.9.1) und auf Chloramphenicol-haltiges Selektivmedium ausplattiert. Einzelne Kolonien von diesen Platten konnten dann in selektivem Flüssigmedium angezogen und daraus das Plasmid präpariert werden (s. 2.4.6.3). Eine Kontrolle der präparierten Plasmide erfolgte über Restriktionsspaltung (s. 2.7.1) und Sequenzierung (s. 2.8.7). Stämme mit korrekten Plasmiden wurden in die Stammhaltung (s. 2.2.2.3) aufgenommen.

2.11.4 Transformation von pMTL007 in *C. acetobutylicum*

Die Vektoren pMTL007 mit den nach Wunsch mutierten Intronsequenzen wurden zuerst in *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANS1) *in vivo* methyliert (s. 2.9.4.3) und dann nach 2.9.4 in *C. acetobutylicum* transformiert und auf Agarplatten mit 12,5 µg/ml Thiamphenicol ausplattiert. Daraus konnte dann aus einzelnen Kolonien eine Sporensuspension, wie in 2.2.2.3 beschrieben, hergestellt und in die Stammhaltung aufgenommen werden.

2.11.5 Induktion der Integration in *C. acetobutylicum*

900 µl CGM mit 12,5 µg/ml Thiamphenicol in 2-ml-Schraubdeckelreaktionsgefäßen wurden mit 100 µl einer Übernacht-Kultur der Transformanten aus 2.11.4 angeimpft und unter anaeroben Bedingungen für ca. 3-4 h bei 37 °C inkubiert. War nach dieser Zeit Wachstum zu erkennen, wurde die Kultur mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann zentrifugiert (4300 * g, 1 min, RT), mit 0,5 ml PBS gewaschen, das Sediment in 1 ml CGM suspendiert und für weitere 3-4 h bei 37 °C regeneriert. Nach der Regeneration wurden 20, 100 und 200 µl der Kultur auf je eine CGM-Platte mit 2,5 µg/ml Clarithromycin ausplattiert, mit Parafilm versiegelt und für einige Tage bei 37 °C inkubiert. Aus einzelnen Kolonien von diesen Agar-Platten konnte, falls es die Inaktivierung des entsprechenden Gens zuließ, eine Sporensuspension (s. 2.2.2.3) hergestellt und diese in die Stammhaltung aufgenommen werden.

PBS (1 x): pH 7,4

NaH ₂ PO ₄	1,44 g	12 mM
Na ₂ HPO ₄	12,49 g	88 mM
NaCl	5,84 g	100 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.11.6 Kontrolle der Integration mittels PCR

Zuerst wurde aus den Integrationsmutanten die Gesamt-DNA präpariert (s. 2.4.1) und mit dieser DNA eine Standard-PCR nach 2.8.1 durchgeführt. Bei der Verwendung des EBS-Universal-„primer“ und eines „primer“, der stromaufwärts im Gen (Integration in „sense“-Orientierung) bzw. stromabwärts im Gen (Integration in „antisense“-Orientierung) bindet, zeigte ein spezifisches PCR-Produkt zusätzlich zur vermittelten Resistenz eine positive Integration in den gewünschten Bestimmungsort auf.

2.12 Arbeiten mit Proteinen

2.12.1 Heterologe Überexpression plasmidkodierter Proteine in *E. coli*

2.12.1.1 „QIAexpress pQE vectors“

Für die Überexpression der Proteine wurden unter anderem die Vektoren pQE-30 und pQE-80L (Qiagen GmbH; Hilden) ausgewählt. Diese Plasmide zeichnen sich durch ein optimiertes Promoter-Operator-Element, bestehend aus dem induzierbaren T5-Promoter des Phagen T5 (wird von der *E. coli* RNA Polymerase erkannt) und zwei *lac*-Operator-Sequenzen aus. Diese Sequenzen gewährleisten eine verstärkte Bindung des Lac-Repressors und damit eine effiziente Repression des starken T5-Promoters. Eine synthetische ribosomale Bindungsstelle (RBSII) sorgt für hohe Translationsraten. Für die Selektion des Plasmides steht das Gen für die Ampicillin-Resistenz zur Verfügung [Sutcliffe, 1979]. Durch das Einbringen des gewünschten Gens in die multiple Klonierungsstelle erfolgt bei beiden Vektoren ein Anhängen von 6 Histidinen an den N-Terminus des produzierten Proteins.

Die Genexpression ist aufgrund der optimierten Promoter-Operator-Region sehr effizient und kann nur in Gegenwart extrem hoher Lac-Repressorkonzentrationen wirksam reguliert und reprimiert werden. Die von der *E. coli*-Wirtszelle bereit gestellte Menge reicht hierfür nicht aus, so dass ein zweites Plasmid, pREP4, benötigt wird, um eine kontrollierte Expression der rekombinanten Proteine zu gewährleisten. Dieses Plasmid besitzt das *neo*-Gen, dessen Produkt eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Außerdem trägt es das *lacI*-Gen [Farabaugh, 1978], wodurch konstitutiv Repressor-Protein gebildet wird. In dem *E. coli*-Stamm M15 (pREP4) sind mehrere Kopien dieses Plasmids enthalten. So ist die Produktion hoher Mengen an Lac-Repressor-Protein, das an die Operator-Sequenzen der pQE-Vektoren bindet und somit die Expression der rekombinanten Proteine gezielt reguliert, gegeben.

Der Vektor pQE-80L trägt ein zusätzliches *lacI*-Gen (genauer: *lacI^q*-Gen, d. h. eine mutierte Form des *lacI*-Gens, wodurch eine sehr große Menge an Lac-Repressor-Protein gebildet wird), wodurch er nach Herstellerangaben vor allem für die Überexpression von sehr toxischen Proteinen geeignet ist. Die Kombination von zwei Repressormolekülen hat eine noch effizientere Unterdrückung der Proteinexpression vor der Induktion zur Folge. Der pQE-80L-Vektor unterscheidet sich aber ansonsten nicht von dem pQE-30-Expressionssystem.

Die Expression rekombinanter Proteine kann wie angedeutet durch die Zugabe von IPTG induziert werden. IPTG bindet an das Lac-Repressor-Protein, inaktiviert dieses und die RNA Polymerase der Wirts-Zelle kann die Sequenz stromabwärts des T5-Promoters transkribieren. Das spezielle zweifache Operator-System der pQE-Expressions-Vektoren in Kombination mit dem hohen Gehalt an Lac-Repressor-Protein garantieren also eine strikte Kontrolle der Transkription rekombinanter Proteine.

Bei der Wahl der Vektoren, der Klonierung, der Überexpression der Proteine und deren Aufreinigung über Ni-Nitrilotriessigsäure wurde das Handbuch „The QIAexpressionist™ - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins“, (Qiagen GmbH; Hilden) zu Rate gezogen.

2.12.1.2 pET-Expressionssystem

Die heterologe Überproduktion von Proteinen in *E. coli* erfolgte auch unter Verwendung des Expressionsvektors pET-28a(+). Das pET-Expressionssystem (Novagen R&D Systems; Wiesbaden) hat den Vorteil, dass es durch Zusammenwirken von Expressionsstamm und -plasmid zu einer sehr geringen Hintergrundexpression und damit Proteinproduktion vor der Induktion kommt.

Der Vektor zeichnet sich durch einen IPTG-induzierbaren T7*lac*-Promoter [Dubendorff und Studier, 1991; Studier et al., 1990] aus. Dieser wird in Abwesenheit des Induktors IPTG durch konstitutive Expression des ebenfalls auf dem Plasmid kodierten *lacI*-Repressorgenprodukts analog zu 2.12.1.1 effizient reprimiert. Das Gen für die T7 RNA-Polymerase, die den T7*lac*-Promoter kontrolliert, liegt auf dem Chromosom des *E. coli*-Expressionsstammes BL21 (DE3) und unterliegt dort wiederum der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters, der auch durch IPTG induziert werden kann. Zusätzlich zu der Kopie auf dem Plasmid befindet sich im Chromosom von *E. coli* BL21 (DE3) ebenfalls das Gen für den Lac-Repressor, *lacI*, und die *lac*-Operator-Sequenz. In Abwesenheit von IPTG reprimiert der Lac-Repressor also zudem den *lacUV5*-Promoter. Durch IPTG-Zugabe wird demnach die

Expression der T7 RNA-Polymerase induziert und das stromabwärts des T7 lac -Promoters gelegene Gen transkribiert. Durch entsprechendes Einbringen des gewünschten Gens in die multiple Klonierungsstelle des Vektors kann ein Anhängen von 6 Histidinen am C- oder N-Terminus des produzierten Proteins erreicht werden. Der Vektor pET-28a(+) verfügt zudem über ein Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin vermittelt.

Der Vektor mit dem zu überexprimierenden Gen wurde auch in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) transformiert. Diese Wirts-Zellen enthalten zusätzlich das Plasmid pRARE. Auf diesem sind tRNA Gene für alle in *E. coli* selten genutzten Aminosäurekodons kodiert (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, CGG). Durch deren Expression wird eine Beeinträchtigung der heterologen Expression durch Häufungen solcher Kodons im zu exprimierenden Gen vermieden [Brinkmann et al., 1989; Del Tito et al., 1995; Rosenberg et al., 1993; Seidel et al., 1992]. Dieses Plasmid trägt zusätzlich eine Chloramphenicol-Resistenz.

Auch hier wurde bei der Überexpression der Proteine und der Aufreinigung über Ni-Nitrilotriessigsäure u. a. das Handbuch „The QIAexpressionist™ - A handbook für high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins“, (Qiagen GmbH) zu Rate gezogen.

2.12.1.3 Überexpression plasmidkodierter Proteine

Zur Überexpression wurden 50-500 ml LB- oder TB-Medium mit 5-10 ml einer ÜN-Kultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes mit dem gewünschten Plasmidkonstrukt beimpft und unter entsprechender Antibiotikaselektion bei 37 °C inkubiert. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-2,8³⁴ wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Kultur weitere 3-4 h inkubiert. Kam es hierbei zu einer starken Schaumbildung, wurde tropfenweise Silikon-Antischaumemulsion zugegeben, bis eine deutliche Wirkung eintrat³⁵. Durch Zentrifugation bei 3000 * g für 10 min und 4 °C wurden die Zellen geerntet. Falls die Proteine über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie (s. 2.12.3) aufgereinigt werden sollten, wurde das Zellsediment einmal mit 10 mM Imidazol-Puffer gewaschen und dieses dann bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Im Falle einer Aufreinigung über PD10-Säulen (s. 2.12.4.2) wurde das Sediment in dem gleichen Puffer ohne Imidazol (Basis-Puffer, pH 8) gewaschen und eingefroren. Zur Kontrolle des Versuchs erfolgte eine Probennahme direkt vor der Induktion und kurz vor der Zellernte. Hierzu wurde 1 ml Zellsuspension entnommen und kurz

34: OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei der Überexpression von CodY, CcpA und Hpr; OD₆₀₀ von 0,8-1 bei der Überexpression der in dieser Arbeit untersuchten Kinasen und Rgg3; OD₆₀₀ von 1,5-2 bei der Überexpression von Spo0A; OD₆₀₀ von 2,8 bei der Überexpression von HprK/P

35: Ca. 2-3 Tropfen

zentrifugiert (14000 * g, 30 s, RT). Die Sedimente wurden in 1 x Protein-Auftragspuffer (s. 2.12.6) gelöst und bis zum Gebrauch auf Eis oder bei -20 °C aufbewahrt. Zur Analyse wurden die Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel (s. 2.12.6) mit anschließendem „Western blot“ (s. 2.12.9, 2.12.10) oder Silber-Färbung (s. 2.12.8) analysiert.

Ein anderes Vorgehen zur Überproduktion von Proteinen³⁶ bestand darin, 250-500 ml TB-Medium mit 5-10 ml einer ÜN-Kultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes mit dem gewünschten Plasmidkonstrukt zu beimpfen und unter entsprechender Antibiotikaselektion für 3 h bei 28 °C schüttelnd zu inkubieren. Die Werte für die OD₆₀₀ lagen dann bei ca. 0,6-1. Anschließend wurde IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Die Kulturen wurden daraufhin 12-18 h über Nacht bei 18 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet, gewaschen und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Basis-Puffer: pH 8

NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	7,8 g	50 mM
NaCl	17,53 g	300 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Imidazol-Stammlösung (250 mM): pH 8

NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	7,8 g	50 mM
NaCl	17,53 g	300 mM
Imidazol	17 g	250 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Für die Herstellung von Imidazol-Puffern anderer Imidazolkonzentrationen wurde diese Imidazol-Stammlösung entsprechend mit dem angegebenen Basis-Puffer gemischt.

2.12.2 Herstellung von Rohextrakten

Zur Herstellung von Rohextrakten aus *E. coli* wurde das Nassgewicht des Zellsediments, das wie in 2.12.1.3 beschrieben erhalten worden war, bestimmt und das Zellsediment anschließend in 3 ml 10 mM Imidazol-Puffer (s. 2.12.1.3) pro g Nassgewicht suspendiert.

36: Für die Überexpression der Kinasen und Rgg3 angewendet

Nach Zugabe von 2 mg Lysozym³⁷ pro g Nassgewicht wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Zellaufschluss in einer vorgekühlten „French® Pressure Cell“, wobei Zellsedimente, die in bis zu 6 ml des 10 mM Imidazol-Puffers aufgenommen wurden, mit der „kleinen“ und Zellsedimente, die in mehr als 6 ml Puffer aufgenommen wurden, mit der „großen“ „French® Pressure Cell“ aufgeschlossen wurden. Die jeweilige Zelle wurde in die „French® Pressure Cell Press“ eingesetzt. Der Aufschluss erfolgte bei einem für die Zelle max. anwendbaren Druck, 4 MPa für die „kleine“ und 13 MPa für die „große“ Zelle, durch vorsichtiges Öffnen des Ventils und die langsame Entnahme der Zellsuspension. Bis zum vollständigen Aufschluss waren zumeist 1 bis 3 Durchgänge erforderlich. Der nach Ultrazentrifugation (150000 * g, 45 min, 4 °C), zur vollständigen Abtrennung aller Zelltrümmer, erhaltene klare Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet und idealerweise sofort weiterverarbeitet oder bei -70 °C eingefroren.

2.12.3 Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure

Um rekombinante Proteine aufzureinigen zu können, welche am N- bzw. C-Terminus einen 6x- Histidin-Rest („*his-tag*“) trugen, fand eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem Nickel²⁺- Ionen statt (Ni-NTA-Agarose). Diese binden mit 4 der 6 freien Koordinationsstellen an eine Agarose-Matrix, wobei mit den 2 freien Koordinationsstellen zwei benachbarte Histidinreste des rekombinanten Proteins gebunden werden können. Diese Bindung ist umso stärker, je mehr benachbarte Histidine in einem Protein enthalten sind. Nach verschiedenen Waschschritten erfolgt die Elution des gebundenen Proteins von der Agarose-Matrix durch das Histidin-Strukturanalogon Imidazol [Schmitt et al., 1993], welches in steigender Konzentration auf die Säule gegeben wird.

Für die native Reinigung im präparativen Maßstab wurde eine leere 10-ml-Plastiksäule mit 500 µl Ni-NTA-Agarose-Lösung gefüllt. Gegen das Auslaufen des Gelmaterials war die Säule nach unten hin mit Filterplättchen abgedichtet. Daraufhin wurde die Säule mit 10 ml eines 10-50 mM Imidazol-Puffers³⁸ äquilibriert. Anschließend wurde der ultrazentrifugierte Rohextrakt (s. 2.12.2) auf die nach unten verschlossene Säule gegeben, mit dem Säulenmaterial durch Schütteln gemischt und 1 h bei 4 °C und wiederholtem Mischen inkubiert. Nach langsamem Abfließen des Rohextraktes durch das Säulenmaterial mit Hilfe der Schwerkraft wurde die Säule einmal mit 20 ml 50 mM Imidazol-Puffer (s. 2.12.1.3) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu lösen. Bei spezifischen

37: Lysozymaktivität: 900000 U/mg

38: 10 mM Imidazol-Puffer für die Aufreinigung von Spo0A, 50 mM Imidazol-Puffer für die Aufreinigung aller anderen in dieser Arbeit aufgereinigten Proteine

Bindungen geschieht die Lösung der Proteine erst bei höheren Konzentrationen (> 75 mM Imidazol). Es folgte die Elution der Proteine mit Imidazol, wobei bei Spo0A ein Stufengradient von 75-250 mM Imidazol (s. 2.12.1.3) verwendet wurde. Alle anderen Proteine dieser Arbeit wurden direkt mit 250 mM Imidazol (s. 2.12.1.3) von der Säule eluiert. Dafür wurden jeweils 2 ml der Imidazol-Lösung auf die Säule gegeben und das Eluat nach 1 min in einem Eppendorfreaktionsgefäß wieder aufgefangen.

Zur Kontrolle wurden 20 µl des Eluats der unterschiedlichen Fraktionen gesammelt, mit 1 x Auftragspuffer (s. 2.12.6) hitzedenaturiert (5 min, 95 °C) und in einem Polyacrylamidgel (s. 2.12.6) elektrophoretisch aufgetrennt. Über eine Silber-Färbung (s. 2.12.8) konnte nun die ideale Waschkonzentration ermittelt und das Protein evtl. mit stringenteren Waschbedingungen aufgereinigt und unspezifisch bindende Proteine noch effektiver abgetrennt werden.

Die Fraktionen, die überwiegend das gewünschte Protein enthielten, wurden entweder über PD10-Säulen (s. 2.12.4.2) oder durch Dialyse (s. 2.12.4.1) einem Pufferwechsel unterzogen und konzentriert. Eine Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte anhand des „Pierce BCA™ Protein Assay“ (s. 2.12.5). Die fertigen Proteinlösungen konnten bei 4 °C gelagert, optimalerweise aber direkt weiterverwendet werden.

Zur Reinigung der Säule wurde diese zweimal mit jeweils 10 ml 250 mM Imidazol-Puffer (s. 2.12.1.3) gewaschen. Die Säule selber wurde anschließend mit 20 % (v/v) Ethanol überschichtet und konnte so bei 4 °C aufbewahrt und mehrmals für die Aufreinigung des gleichen Proteins wiederverwendet werden.

2.12.4 Konzentrieren und Entsalzen von Proteinlösungen

2.12.4.1 Dialyse

Eine schnelle und effiziente Methode, sowohl für einen Pufferwechsel als auch für das Konzentrieren von Proteinlösungen, stellt die Dialyse dar. Die Dialyseschläuche (Servapor® Dialyseschläuche) wurden vor Benutzung in 50 mM EDTA-Lösung für einige Minuten gekocht, mit Wasser gespült und bis zur Verwendung in 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

Die gesamte Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch mit 16 mm Durchmesser mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa gegeben. Dieser wurde mit Klemmen verschlossen und in einem 2 l Becherglass mit 2 l Dialyse-Puffer (Puffervolumen entspricht dem 1000fachen

Volumen der Proteinlösung) befestigt. Die Dialyse selber erfolgte unter langsamem Rühren bei 4 °C über Nacht.

Anschließend konnte die Proteinlösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Bestenfalls wurden die aufgereinigten Proteine aus Stabilitätsgründen gleich in weiterführende Versuche eingesetzt.

Dialyse-Puffer: pH 7,4

Na ₂ HPO ₄	12,49 g	88 mM
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	1,66 g	12 mM
Glycerin	100 ml	1,4 M
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.12.4.2 PD10-Säulen

Um den Puffer von Proteinlösungen zu wechseln bzw. die Proben von Salzen und niedermolekularen Stoffen zu trennen, wurde eine Gelfiltration über PD10-Säulen mit Sephadex™ G-25-Matrix entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden die Säulen zuerst mit 25 ml Dialysepuffer (2.12.4.1, ohne Glycerin) equilibriert, dann mit genau 2,5 ml Proteinlösung beladen (bei geringeren Volumina wurde mit Dialysepuffer auf genau 2,5 ml aufgefüllt) und anschließend mit genau 3,5 ml Dialysepuffer eluiert. Anschließend konnte die Proteinlösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Bestenfalls wurden die aufgereinigten Proteine aus Stabilitätsgründen gleich in weiterführende Versuche eingesetzt.

2.12.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach „Pierce“

Eine sehr einfache und schnelle Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen ist der „Pierce BCA™ Protein Assay“. Diese Methode kombiniert die bekannte Biuret-Reaktion, also die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Protein in alkalischem Medium [Levin und Brauer, 1951] mit der hoch sensitiven Detektion von Cu¹⁺ durch Nutzung des BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure) [Smith et al., 1985]. Das blau gefärbte Reaktionsprodukt, ein Komplex aus 2 Molekülen BCA und einem Kupferion, zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, die in einem Bereich von 20 bis 2000 µg/ml Protein linear ist. Die Messung wurde nach Angaben des Herstellers in „96-well-plates“ durchgeführt, wobei 25 µl Standard bzw. Probe zu 200 µl BCA-Arbeitslösung gegeben und der Ansatz 30 Minuten bei 37 °C inkubiert

wurde. Die Absorption der Proben war mit einem Spektrophotometer („anthos htIII-Reader“) detektierbar. In Abhängigkeit von der zuvor erstellten Kalibriergerade konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Bei der Durchführung des Tests sollte vor allem auf folgende Punkte geachtet werden:

- Die zu bestimmende Probe darf keine reduzierenden Stoffe wie z. B. DTT enthalten, da diese durch Reduktion des Cu^{2+} die Proteinbestimmung stark verfälschen würden.
- Bei der zu Grunde liegenden Reaktion handelt es sich nicht um eine Endpunktbestimmung. Die Verfärbung nimmt stetig zu und die Proteinkonzentration definiert sich über die Geschwindigkeit der Reaktion. Zügiges Arbeiten und eine immer gleichzeitig erstellte Kalibriergerade sind deshalb obligatorisch.

2.12.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Zur Kontrolle der Aufreinigung überproduzierter Proteine, zur Größenbestimmung von Proteinen und zur Auftrennung von Proteinen vor dem Transfer auf Nylonmembranen („Western blot“) diente die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli (1970)). Das Gießen der Gele erfolgte mittels einer Biometra-Plattengelapparatur (Biometra® biomedizinische Analytik GmbH; Göttingen), wodurch 11 x 7 x 0,1 cm große Gele entstanden. Üblicherweise bestanden die Gele aus einem 10%igen Trenngel und einem darüberliegenden, ca. 1 cm breiten 4%igen Sammelgel. Die genaue Zusammensetzung und Übersicht über die Bestandteile eines Gels ist in folgender Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines 10%igen SDS-Gels.

Acrylamid-Konzentration (w/v)		Trenngel	Sammelgel
		10 %	4 %
H ₂ O	[ml]	4,17	3,25
Rotiphorese® Gel 40 ³⁹	[ml]	2,08	0,5
Trenngelpuffer	[ml]	2,08	--
Sammelgelpuffer	[ml]	--	1,25
TEMED	[µl]	7,5	15
APS (10 % (w/v))	[µl]	75	30

Zunächst wurden die einzelnen Komponenten des Trenngels bis auf das APS und das TEMED zusammengegeben und gut gemischt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und APS gestartet. Nun erfolgte das Einfüllen des Trenngels in die zuvor mit Wasser und Isopropanol gereinigte und gut abgedichtete Plattengelapparatur bis ca. 1 cm unter den Rand der Ohrenplatte. Um das Austrocknen zu verhindern, wurde das Gel vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach ca. 30-45 min war die erfolgreiche Polymerisation an einer scharfen Linie zwischen dem Wasser und dem Trenngel erkennbar und das Wasser konnte abgegossen werden. Nach dem vorsichtigen Entfernen aller Wasserreste mit einem Zellstofftuch wurde das Sammelgel bis an die oberste Kante der Ohrenplatte gegossen und ein Kamm zur Ausbildung der Geltaschen eingesetzt. Fertig gegossene und auspolymerisierte Gele konnten in Frischhaltefolie gewickelt bei 4 °C im Kühlschrank einige Wochen gelagert werden.

Nach Polymerisieren des Sammelgels wurde der Dichtungsgummi entfernt und die Glasplatten mit dem Gel in die Laufkammer eingesetzt. Nach Zugabe von 1 x SDS-Laufpuffer wurde der Kamm entfernt und alle Taschen gründlich mit Puffer gespült. Um eine gleichmäßige Laufront zu erhalten, wurden mit einer Spritze die Luftblasen, die sich am unteren Teil des Gels zwischen den Glasplatten gebildet hatten, entfernt.

Die zu trennenden Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit Protein-Ladepuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Etwa 15 µl der einzelnen Proben konnten nun in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden. Die Elektrophorese erfolgte bei einem konstanten Strom von 35 mA pro Gel. Sobald die Bromphenollaufront nach ca. 1 h das Ende des Gels erreicht hatte und in den Laufpuffer lief, wurde die Elektrophorese beendet.

39: 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1

Trenngelpuffer: pH 8,8 (mit HCl eingestellt)

Tris	181,72 g	1,5 M
SDS	4 g	13,9 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Sammelgelpuffer: pH 6,8 (mit HCl eingestellt)

Tris	60,56 g	0,5 M
SDS	4 g	13,9 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

SDS-Laufpuffer (10 x):

Tris	30,3 g	0,25 M
Glycin	142,6 g	1,92 M
SDS	10 g	34,7 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Protein-Ladepuffer (4 x): pH 6,8 (mit HCl eingestellt)

Tris	1,51 g	0,25 M
SDS	2 g	138,7 mM
Glycerin	20 ml	5,5 M
Bromphenolblau	20 mg	578 µM
2-Mercaptoethanol	10 ml	2,9 M
H ₂ O	ad 50 ml	

Der Ladepuffer konnte bei -20 °C gelagert werden.

2.12.7 Größenbestimmung von im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinen

In der denaturierenden SDS-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. Dies wird durch das Detergenz SDS erreicht, das die native Struktur der Proteine zerstört und sie zu einer frei beweglichen Kette entfaltet. 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. Um eventuell störende Disulfidbrücken zu lösen, wird das Protein außerdem mit 2-Mercaptoethanol⁴⁰ inkubiert. 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. Für die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde deshalb als Größenstandard eine „PageRuler™ Prestained Protein Ladder™“ (7,5 µl, ohne Vorab-Denaturierung) neben den Proben in eine Tasche des Gels mit aufgetragen und aufgetrennt. Die Proteine des Standards waren bereits vorgefärbt, so dass die Trennung während des Gellaufs verfolgt werden konnte. Somit waren Banden bei 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa und 10 kDa zu erkennen. Ein weiterer Vorteil dieses Markers war, dass er bei einem Transfer auf eine Membran seine Farbe nicht verlor und so auch bei immunologischen Nachweisen (s. 2.12.9, 2.12.10) zum Größenvergleich herangezogen werden konnte.

2.12.8 Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen über Silber-Färbung

Mit Hilfe der Silber-Färbung, modifiziert nach Blum et al. (1987), konnten in Polyacrylamidgelen auch geringe Proteinmengen ab 2 bis 5 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden.

Das Gel wurde im Anschluss an die Elektrophorese für mindestens 30 min oder über Nacht in Fixierlösung inkubiert, 2 x 10 min mit Ethanol (50 %, (v/v)) gewaschen und 1 min in Thiosulfatlösung geschwenkt. Nach 3 x Waschen mit H₂O für jeweils 30 s und 15minütiger Inkubation in Silbernitratlösung wurde das Gel erneut für 2 x 30 s mit H₂O gewaschen. Durch Zugabe von Entwicklerlösung erfolgte die Entwicklung der Banden, die durch kurzes Spülen in H₂O und Schwenken in „Stopp“-Lösung abgebrochen werden konnte, wenn die Banden die

40: Im Ladepuffer enthalten

gewünschte Intensität aufwiesen. Das Gel wurde in einer Geldokumentationsanlage fotografiert und das entstandene Bild digitalisiert.

Fixierlösung:

Methanol	500 ml	12,3 M
Eisessig	120 ml	2,1 M
Formaldehydlösung (37 % (v/v))	0,5 ml	13,6 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Thiosulfatlösung:

Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O	0,2 g	810 µM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Silbernitratlösung:

AgNO ₃	0,2 g	12 mM
Formaldehydlösung (37 % (v/v))	75 µl	20,4 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

Die Silbernitratlösung wurde erst kurz vor Gebrauch angesetzt.

Entwicklerlösung:

Na ₂ CO ₃	60 g	566 mM
Thiosulfatlösung	20 ml	16,2 µM
Formaldehydlösung (37 % (v/v))	0,5 ml	13,6 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

„Stopp“-Lösung:

EDTA	14,6 g	50 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.12.9 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen („Western blot“)

Mit Hilfe des „Western blot“ werden Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, welche anschließend mittels Antikörpern nachgewiesen werden können. Die Vorgehensweise richtet sich hierbei nach einer modifizierten Methode von Towbin et al. (1979).

Für den Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran („Hybond™ECL™“) wurden diese über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.12.6) entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt und nach Beendigung des Gellaufs das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Es folgte eine Inkubation des Gels für 20 min und RT in einem Transferpuffer. Währenddessen wurden vier Stück „Whatman“-Papier und eine Membran aus Nitrocellulose auf die Größe des Gels zugeschnitten. Nachdem die „Whatman“-Filter und die Membran mit Transferpuffer durchtränkt und die Graphitelektroden der Elektroblo-Apparatur mit Puffer befeuchtet worden waren, konnte die Apparatur wie folgt aufgebaut werden: Auf der Anodenseite wurden in nachstehender Reihenfolge luftblasenfrei 2 Lagen transferpuffergesättigtes „Whatman“-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das äquilibriumierte Gel sowie zwei weitere Lagen „Whatman“-Papier passgenau übereinander geschichtet. Überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die Kathode wurde aufgelegt und es erfolgte der Transfer in Abhängigkeit von der Gelfläche (3,5 mA/cm²) für ca. 45 min. Durch einen elektrischen Stromfluss und die negative Ladung der Proteine kommt es in der Elektroblo-Apparatur („BlueFlash-XL“) zu einer Migration der Proteine aus dem Gel in Richtung der Anode und zur Fixierung der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran. Die Membran wurde nach dem Transfer sofort für die Proteindetektion mit Antikörpern eingesetzt.

Transferpuffer:

Tris	3,03 g	25 mM
Glycin	14,4 g	192 mM
SDS (10 % (w/v))	3,75 ml	1,4 mM
Methanol	200 ml	4,9 M
H ₂ O	ad 1000 ml	

2.12.10 Detektion rekombinanter „his-tag“-Fusionsproteine mit Antikörpern

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem „Western blot“ zunächst über Nacht in „Blocking“-Reagenz zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Diese Inkubation wurde bei Raumtemperatur unter stetigem Schütteln durchgeführt. Um das überschüssige „Blocking“-Reagenz zu entfernen, wurde die Membran 3 x mit ca. 10 ml 1 x „Western blot“-PBS-Puffer für jeweils 5 min gewaschen.

Zur spezifischen Detektion von „his-tag“-Fusionsproteinen wurde die Membran mit dem Erst-Antikörper („Maus-Anti-His₆“⁴¹, 1:250 in 10 ml „Blocking“-Reagenz) für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS-Puffer für jeweils 5 min, um die nichtgebundenen Reste des Antikörpers zu entfernen, erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers („Peroxidase konjugiertes Esel-Anti-Maus IgG“⁴², 1:50000 in 10 ml „Blocking“-Reagenz) gegen die Epitope des Erst-Antikörpers. Der Zweit-Antikörper war mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, über dessen Aktivität anschließend die Detektion dieses Antikörpers erfolgen kann. Die Inkubation mit diesem zweiten Antikörper erfolgte wieder unter ständigem Schütteln für 1 h bei RT. Die Membran wurde anschließend 3 x mit je 10 ml 1 x „Western blot“-PBS-Puffer, zur Verringerung des Hintergrunds 3 x mit je 10 ml 1 x PBS-Tween-Puffer (1 x „Western blot“-PBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Tween20) und abschließend wieder 3 x mit je 10 ml 1 x „Western blot“-PBS-Puffer gewaschen. Dabei dauerte jeder Waschschrift 5 min. Anschließend geschah die Detektion über Chemilumineszenz. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des „ECL-Kit“ nach Herstellerangaben. Die „ECLTM-Western Blotting Detection Reagents“ enthalten Luminol, welches durch die Meerrettich-Peroxidase zu 3-Aminophthalat unter Lichtemission oxidiert

41: Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen 6x-Histidin-Reste (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim)

42: Monoklonale Antikörper aus dem Esel gegen 1. Antikörper aus der Maus, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., vertrieben durch Dianova, Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostik mbH; Hamburg)

wird. Nach kurzer Überschichtung der Membran mit einem Gemisch der „ECL™-Western Blotting Detection Reagents“ 1 und 2 zu gleichen Teilen wurde der Röntgenfilm auf die zwischen Kopierfolie platzierte Membran aufgelegt und so in der Filmkassette belichtet. Nach durchschnittlich 30 s – 2 min konnte der Film entwickelt werden.

„Western blot“-PBS-Puffer (1 x): pH 7,6

NaH ₂ PO ₄	1,83 g	15 mM
NaCl	5,84 g	100 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	15,67 g	88 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

„Blocking“-Reagenz:

1 % „Blocking Reagent“ in 1 x „Western blot“-PBS-Puffer

2.12.11 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Rohextrakten von rekombinanten *C. acetobutylicum* beruht auf der Umsetzung von Luciferin, ATP und molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin, AMP, PPi, CO₂ und Licht. Das Enzym Luciferase aus der amerikanischen Feuerfliege *Photinus pyralis* katalysiert dabei diese Reaktion, die zusätzlich Mg²⁺ benötigt. Die Menge an emittiertem Licht ist abhängig von der gebildeten Menge an Luciferase und damit von der Zellmasse (OD).

Zur Bestimmung der Lumineszenz wurden 2 ml einer rekombinanten *C. acetobutylicum*-Kultur entnommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, 14000 * g, 4 °C) wurden die Zellen zum Waschen in 2 ml KP-Puffer (pH 7, 50 mM) suspendiert. Die Lösung wurde kräftig geschüttelt, um eine Sauerstoffsättigung zu gewährleisten. Es folgte die Überführung von 112,5 µl der Probelösung in ein NUNC-Röhrchen (Sarstedt AG & Co.; Nürnbrecht), wobei ab diesem Zeitpunkt alle Proben auf Eis gehalten wurden. Um genügend ATP in der Reaktion für die Umsetzung von Luciferin zu gewährleisten, wurden dem Ansatz 37,5 µl einer 100 mM ATP-Stammlösung zugegeben. Die Lichtemission konnte anschließend in einem Luminometer quantitativ bestimmt werden. Im Gerät wurden dem Testansatz dafür vor der Messung automatisch erst 150 µl Reagenz 1 dazugegeben und nach Mischen weitere 150 µl Reagenz 2 (330 µM Luciferin in KP-Puffer (10 mM, pH 6,5), das entspricht etwa 1 mg Luciferin in

10 ml KP-Puffer (10 mM, pH 6,5)). Es folgte die Messung der Lumineszenz in einem Zeitfenster von 15 s.

Um die gemessenen „relative light units“ (RLU) über die Wachstumszeit darstellen zu können, erfolgte die Bildung des Quotienten zu der vorher gemessenen optischen Dichte bei 600 nm. Zur Kontrolle sollte parallel auch die Aktivität von Rohextrakt eines rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stamms ohne jeglichen Promoter vor dem Gen der Luciferase mitgemessen und der Wert als Hintergrund von den ermittelten Werten der Lumineszenz abgezogen werden.

KP-Puffer: 50 mM, pH 7⁴³

KH ₂ PO ₄	265 mg
K ₂ HPO ₄	530 mg
H ₂ O	ad 100 ml

KP-Puffer: 10 mM, pH 6,5⁴³

KH ₂ PO ₄	93 mg
K ₂ HPO ₄	55 mg
H ₂ O	ad 100 ml

Reagenz 1: Assay-Puffer (2 x), pH 7,8

Glycyl-Glycin	825,75 mg	62,5 mM
MgCl ₂	508,25 mg	25 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

2.12.12 Phosphorylierung von Proteinen mit radioaktiver Markierung

Um herauszufinden, welche Kinase für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortlich ist, wurden Aliquots der verschiedenen Kinase-Proteinlösungen, die, wie in 2.12.1.3, 2.12.2 und 2.12.3 beschrieben, erhalten worden waren, zusammen mit Spo0A, ATP, einem Phosphat-Puffer und radioaktiv markiertem [γ -³²P]-ATP inkubiert.

43: Aus: „Lab FAQs-Find a Quick Solution“ (Roche Molecular Biochemicals); siehe auch Sambrook et al. (2001)

Ein Ansatz hatte dabei grundsätzlich ein Gesamtvolumen von 20 µl und war für den Phosphorylierungsversuch von Spo0A folgendermaßen zusammengesetzt:

Phosphorylierungs-Puffer (10 x)	2 µl	1 x
ATP-Lösung [50 mM]	2 µl	5 mM
[γ - ³² P]-ATP [5 µCi/µl]	1 µl	5 µCi
Spo0A	x µl	1,5-2 µg
Proteinlösung	5 µl	
H ₂ O	ad 20 µl	

Parallel wurde als Positivkontrolle der gleiche Ansatz mit dem Protein Hpr (ca. 3 µg) und dessen Kinase HprK/P (ca. 0,5 µg) zusammengestellt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Spo0A und einer „Proteinlösung“, die allerdings kein Protein enthielt, sondern aus dem pET-28a(+)-Leervektor bestand, ansonsten aber gleich den anderen überexprimierten Proteinen aufgeschlossen und aufgereinigt worden war. Schließlich wurde noch ein letzter Ansatz gänzlich ohne Protein zusammenpipettiert.

Alle Ansätze wurden 1 h bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert und anschließend mit 10 µl des Auftragspuffers (4 x; s. 2.12.6) versetzt. Nachdem die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert worden waren, schloss sich eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem 10%igen SDS-Gel an (s. 2.12.6).

Danach wurde das Gel vorsichtig von der oberen kleineren Glasplatte gelöst und auf ein „Whatman“-Papier übertragen. Mit einer handelsüblichen Frischhaltefolie überdeckt konnte das Gel auf einer Gel Trocknungsanlage unter Vakuum bei 70 °C für ca. 30 min getrocknet und anschließend in eine Exponierkassette („HypercassetteTM“) gelegt werden. In einer Dunkelkammer erfolgte die Exposition auf einem „HyperfilmTM MP“-Film. Nach durchschnittlich 24 h (bei sehr schwachen Signalen auch 2-3 Tagen) konnte der Film entwickelt und ausgewertet werden.

Phosphorylierungs-Puffer (10 x): pH 7,7 (mit HCl eingestellt)

Tris	6,06 g	500 mM
MgCl ₂	2,03 g	100 mM
DTT	154,2 mg	10 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

Da DTT in Lösung sehr instabil ist, wurden zuerst Tris und MgCl₂ in Wasser gelöst und der pH eingestellt. Erst dann erfolgte die Zugabe von DTT. Der Phosphorylierungs-Puffer wurde stets frisch angesetzt, konnte aber bis zum Gebrauch am selben Tag bei 4 °C gelagert werden.

2.13 Internetrecherchen

Internetrecherchen für Sequenzabgleiche, Datenbankvergleiche, Protein- und DNA-Strukturen und Literatur wurden auf folgenden Internetseiten vorgenommen:

gopubmed: <http://www.gopubmed.org/>

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/>

Pfam (Proteinfamilien und HMMs): <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>

Sequence manipulation Suite: <http://www.bioinformatics.org/sms2/>

Swiss-Prot/EMBL: <http://us.expasy.org/sprot/>

„Codon Usage Database“: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

„primer“-Design für „TargeTron™ Gene Knockout System“: <http://www.sigma-genosys.com/targetron/>

„Mfold“: <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>

„WebLogo“: <http://weblogo.berkeley.edu>

„prodoric“: http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp_promoter.php

„Berkeley Drosophila Genome Project“: http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html

„MultAlin“: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

„Database Collection“: <http://biocyc.org/>

2.14 Gase, Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Gase für anaerobe Arbeiten bzw. Analysen am Gaschromatographen wurden von der Firma MTI Industriegase AG (Neu-Ulm) geliefert.

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Merck KGaA (Darmstadt), Riedel de Hën AG (Seelze), Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen und besaßen mindestens p. a.-Qualität.

Spezielle Chemikalien, Enzyme oder sonstige Produkte stammten von folgenden Firmen:

Abbott GmbH; Wiesbaden:

Clarithromycin

Ambion; Witney Oxon, USA:

„RNASE ZAP“

Biomers.net GmbH; Ulm:

Oligonukleotide

Biomol Feinchemikalien GmbH; Hamburg:

Lysozym

Biozym Scientific GmbH; Oldendorf :

Elektroporationsküvetten (2 mm/4 mm)

Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe:

IPTG

Roti®-P/C/I

Roti®-Aqua-P/C/I

Rotiphorese® Gel 40

Silikon-Antischaumemulsion

TEMED

Epicentre Biotechnologies; Madison, USA vertrieben durch Biozym Scientific GmbH; Oldendorf:

FailSafe™ PCR System

SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ Sequencing Kit-LC

Fermentas GmbH; St. Leon-Rot:

Desoxyribonuklease I, RNase free

dNTP-Mischung

GeneRuler™ DNA Ladder-Mischung

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

High Fidelity-*Taq*-DNA-Polymerase

Loading Dye Solution (Ladepuffer (6 x))

M-MuLV-Reverse Transkriptase

PNK-Reaktionspuffer A (10 x)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder™

Restriktionsendonukleasen

RNA Ladder, High Range

RNase A (DNase frei)

RNase Inhibitor „RiboLock™

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

Taq-DNA-Polymerase

T4-DNA-Ligase

T4-Polynukleotidkinase (PNK)

GE Healthcare Europe GmbH; München:

ECL™-Western Blotting Detection Reagents

Hypercassette™

Hyperfilm™ MP

MicroSpin™ G-25 Columns

Nitrocellulose-Membran Hybond™ECL

PD10-Säulen mit Sephadex™ G-25-Matrix

Ready-to-Go PureTaq™ PCR-Beads

T7 Sequencing Kit

Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen:

Einwegimpfösen

Mikrotiterplatten (Microtiter® System)

Invitrogen GmbH; Karlsruhe:

UltraPure Agarose

Desoxyribonuklease I

D-Luciferin, sodium salt

SuperScript™ II RNase H⁻-Kit

Millipore GmbH; Schwalbach:

Microcon® YM-100 Centrifugal Filter Units

Dialysefilter: Millipore VS Membranfilter, Porengröße 0,025 µm

MO BIO Laboratories, Inc.; Carlsbad, California, USA, vertrieben durch Süd-Laborbedarf; Gauting:

UltraClean™15 DNA Purification Kit

MWG Biotech AG; Ebersberg:

Oligonukleotide

IRD800-markierte Oligonukleotide

National Diagnostics; Hull, England:

SequGel XR-Acrylamid-Lösung

SequGel XR-Puffer-Lösung

New England Biolabs GmbH; Schwalbach:

Restriktionsendonukleasen

Antarctic Phosphatase (AP)

PAN-Biotech GmbH; Aidenbach:

PowerScript Short DNA Polymerase

PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen:

Elektroporationsküvetten (2 mm/4 mm)

peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I

Pierce Biotechnology, Inc.; Rockford, Illinois, USA, vertrieben durch Perbio Science Deutschland GmbH; Bonn:

Pierce BCA™ Protein Assay

Qiagen GmbH; Hilden:

Ni-NTA-Agarose

RNeasy™-Mini Kit

Roche Diagnostics GmbH; Mannheim:

Ampicillin

ATP

Blocking-Reagenz

DNase I (RNase-frei)

Kanamycin

Proteinase K

5'/3' RACE Kit, 2nd Generation

Thiamphenicol

SARSTEDT AG & Co.; Nümbrecht:

Falcon-Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)

Sartorius AG; Göttingen:

Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)

Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg:

Chloramphenicol

Servapor[®] Dialyseschläuche

Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen:

Clarithromycin

Erythromycin

Kanamycin

TargeTron[®] Gene Knockout System

Tetracyclin-Hydrochlorid

VWR International GmbH; Darmstadt

Einmalküvetten (Halb-Mikro, 1,6 ml)

Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 2-ml-Schraubdeckelröhrchen)

Die nachfolgend aufgelisteten Geräte (Tab. 6) wurden für die Durchführung der Arbeiten verwendet, wobei Abweichungen bzw. Ergänzungen dazu gegebenenfalls dem Text zu entnehmen sind.

Tabelle 6: Verwendete Geräte.

Gerät	Firma und Firmensitz
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Werkstatt der Universität Ulm
Autoklav	H+P Labortechnik GmbH; Oberschleißheim
Autoklav	ZIRBUS technology GmbH; Bad Grund
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Eismaschine Scotsman AF-20	William Wurzbach Company; San Francisco, USA
Elektroblot-Apparatur BlueFlash-XL	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Electrophoresis Power Supply EPS601	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg
Electrophoresis Power Supply ST 606	Gibco BRL Life Technologies; Eggenstein
Elektroporationsgerät Gene-Pulser® II	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Feinwaage AE 16S	Mettler-Toledo GmbH; Gießen
Fermenter 1 l	Biostat®B-Fermenter, B. Braun Biotech GmbH; Melsungen
French® Pressure Cell Press	SLM Instruments Inc.; Urbana, IL, USA
Geltrocknungsanlage	Biometra GmbH i. L.; Göttingen
Heizblock Thermoblock 1.0	Störk GmbH & Co. KG; Stuttgart
Heizpilz 2 l	Isopad GmbH; Heidelberg
Inkubationsschüttler G24	New Brunswick Scientific GmbH;
Environmental Incubation Shaker	Nürtingen
Inkubationsschüttler HF	Infors AG; Bottmingen, Schweiz
Kühlregal	Sümak GmbH; Stuttgart
Kühlschrank	Liebherr-Holding GmbH; Biberach/Riß
Kolbenschüttler Certomat SII	Sartorius AG; Göttingen

Gerät	Firma und Firmensitz
LICOR® 4000L	MWG Biotech AG; Ebersberg
Luminometer flash'n glow	Berthold Detection Systems; Pforzheim
Magnetrührer MR 2000	Heidolph Instruments GmbH; Schwabach
Mikrotiterplattenphotometer htIII	Anthos Mikrosysteme GmbH; Krefeld
Mikroskop Axioskop	Carl Zeiss AG; Oberkochen
Mikrowellengerät	SAMOU GmbH; Radolfzell
Moulinex OPTIQUICK	
PCR-Maschine	Biozym Diagnostik GmbH; Oldendorf
PTC-200® Peltier Thermal Cycler	
PCR-Maschine Techne	Labtech International; Burkhardtsdorf
pH-Meßgerät WTW pH 521	Wissenschaftliche-Technische Werkstätten; Weilheim
Phosphoimager	Raytest GmbH; Staubenhardt
Bio Imager FUJIX BAS 1000	
Photodokumentationsanlage	MWG Biotech GmbH; Ebersberg
GelPrint 2000i	
Photometer	Amersham Bioscience Europe GmbH;
UltroSpec® 3000-Spektralphotometer	Freiburg
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer	Biometra GmbH i. L.; Göttingen
Präzisions-pH-Meter WTW pH 530	Wissenschaftliche-Technische Werkstätten; Weilheim
Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH; Schwabach
Heidolph REAX 2000	
Reinstwasseranlage Elgastat Maxima	USF Deutschland GmbH; Ransbach-Baumbach
Sequenzierapparatur Model S2	Gibco BRL Life Technologies; Eggenstein
Spektralphotometer Ultrospec® 3000	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg
Spektrphotometer anthos htIII-Reader	Anthos Mikrosysteme GmbH; Krefeld
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr-Holding GmbH; Biberach / Riß

Gerät	Firma und Firmensitz
Tiefkühlschrank -70 °C	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Ultraschall Sonifier W-250	Branson Sonic Power; Danbury USA
Ultrazentrifuge L8-60M	Beckman Coulter GmbH; Krefeld
UV-Transilluminator Bio View, 365 nm	biostep GmbH; Jahnsdorf
Vakuumzentrifuge SpeedVac Concentrator SVC 100H „vortexer“	Savant Instruments; Farmingdale N.Y., USA Heidolph Instruments GmbH; Schwabach
Waage BP8100	Sartorius AG; Göttingen
Wasserbad	GFL; Burgwedel
Whatman-Papier Biometra	Biometra GmbH i. L.; Göttingen
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5402	Eppendorf AG; Hamburg
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG; Hamburg
Zentrifuge Eppendorf <i>mini Spin</i>	Eppendorf AG; Hamburg
Zentrifuge Heraeus Biofuge <i>pico</i>	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Zentrifuge Hermle Z 231M	Hermle Labortechnik; Wehingen
Zentrifuge Hermle ZK 401	Hermle Labortechnik; Wehingen
Zentrifuge Hettich EBA 3 S	Andreas Hettich GmbH & Co KG; Tuttlingen
Zentrifuge Sigma 202 MK	Sigma Laborzentrifugen GmbH; Osterode
Zentrifuge Sigma SK 30	Sigma Laborzentrifugen GmbH; Osterode
Zentrifuge Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH; Osterode
Zentrifuge Sigma 3MK	Sigma Laborzentrifugen GmbH; Osterode

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *spo0A* aus *Clostridium acetobutylicum*

In *Bacillus subtilis* ist bekannt, dass *spo0A* abhängig von der Wachstumsphase von zwei verschiedenen Promotoren aus transkribiert wird. Der erste, σ^A -abhängige Promoter ist während des vegetativen Wachstums von *B. subtilis* aktiv, wodurch die Menge an Spo0A konstitutiv niedrig gehalten wird. Zu Beginn der stationären Phase kommt ein zweiter, σ^H -abhängiger Promoter hinzu, der hohe Mengen an für die Sporulation nötigem Regulatorprotein gewährleistet [Stragier und Losick, 1996].

Mit Hilfe einer nicht radioaktiven „primer extension“-Reaktion war bereits in einer vorhergehenden Arbeit von Concha Hollergschwandner [Hollergschwandner, 2003] der Transkriptionsstart von *spo0A* untersucht worden. Die für dieses Experiment nötige RNA war zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur isoliert worden. Die „primer extension“-Analysen waren mit dem Oligonukleotid Primex0A an dem automatischen Sequenziergerät Li-COR® 4000L durchgeführt worden [Näheres dazu: Hollergschwandner, 2003]. In der Abbildung 4 sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst.

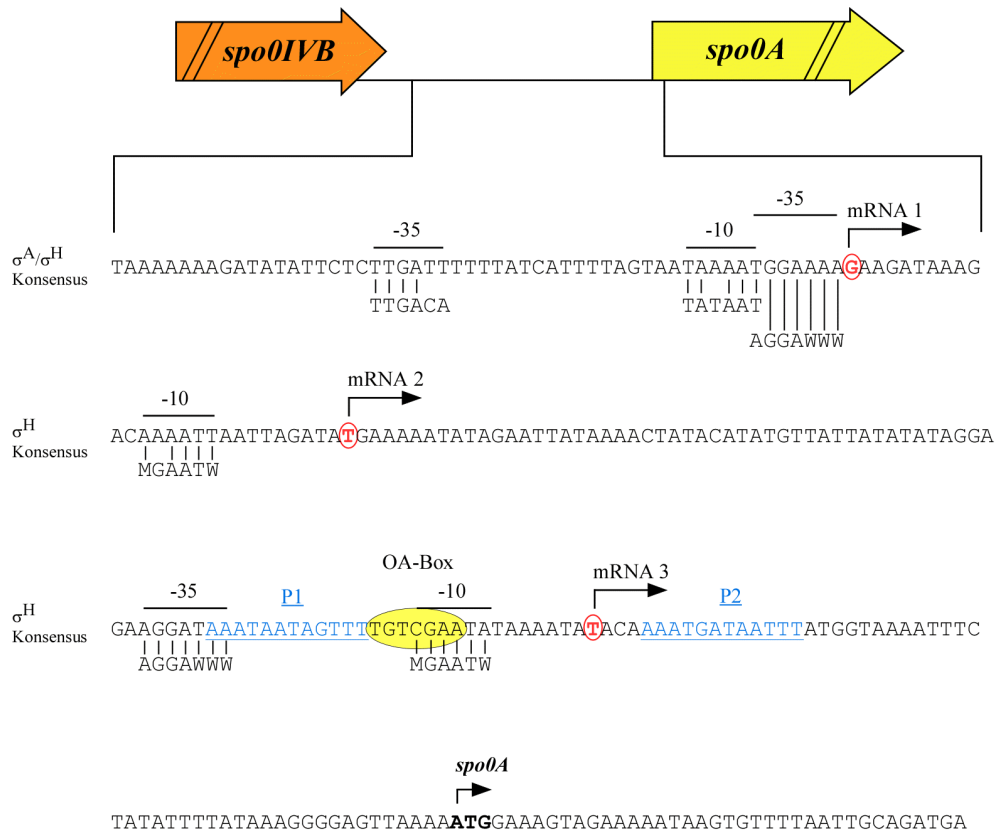


Abbildung 4: Lage der postulierten Transkriptionsstartpunkte von *spo0A* in der intergenen Region zwischen *spo0IVB* und *spo0A*. Dargestellt ist die intergene Region zwischen *spo0IVB* und *spo0A* und auszugsweise die Sequenz, die die potentiellen Transkriptionsstartpunkte S1-S3 (bzw. mRNA 1-3) und die dazu abgeleiteten -10- und -35-Regionen beinhaltet. Die Palindrome sind unterstrichen und die putative OA-Box ist eingekreist. Die verschiedenen Startpunkte sind mit Pfeilen gekennzeichnet und farbig hervorgehoben. Der Translationsstart von Spo0A ist ebenfalls mit einem Pfeil gekennzeichnet [Hollerschwandner, 2003]. W = A, T; M = A, C.

Für die Ableitung entsprechender -10- und -35-Regionen wurden die Konsensussequenzen der Sigmafaktoren σ^A - und σ^H aus *B. subtilis* herangezogen, die auf der frei zugänglichen Seite <http://dbtbs.hgc.jp/> im Internet eingesehen werden können. Nach einem Abgleich mit in Tomas et al. (2003) verwendeten Konsensussequenzen aus *C. acetobutylicum* wurde in der vorliegenden Arbeit nach folgenden -10- und -35-Sequenzen gesucht:

Konsensus σ^A : TTGACA (-35), TATAAT (-10);

Konsensus σ^H : AGGAWWW (-35), MGAATW (-10).

Insgesamt konnten von Concha Hollergschwandner drei Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden, wobei ein eindeutiges Signal 164 Bp vor dem Translationsstart von *Spo0A* lag und dessen abgeleitete -10- und -35-Regionen eine 75%ige Identität zu σ^A -abhängigen Promotoren aufwies. Eine gleichmäßige Intensität der erhaltenen Signale in verschiedenen Wachstumsphasen bekräftigte eine konstitutive Expression von *spo0A*. Ein deutlicher zweiter Startpunkt konnte nicht identifiziert werden, jedoch waren die häufigsten Signale 54 bzw. 137 Bp stromaufwärts vom Startkodon von *spo0A* zu erkennen. Deren abgeleitete -10- und -35-Regionen waren zu σ^H -abhängigen Promotoren ähnlich. Allerdings ließen eine äußerst schwache Intensität der Signale zu unterschiedlichen Zeiten im Wachstum und die Tatsache, dass sich diese beiden Startpunkte in einem Bereich ausgeprägter Sekundärstrukturen befinden, auch eine RNA-Prozessierung als nicht unwahrscheinlich erscheinen.

In weiterführenden Wachstums- und „primer extension“-Versuchen sollten demnach im Rahmen der vorliegenden Arbeit die postulierten Transkriptionsstartpunkte von *spo0A* in *C. acetobutylicum*, d. h. mindestens ein σ^A - und ein σ^H -abhängiger verifiziert werden, um Ähnlichkeiten im Transkriptionsmuster von *spo0A* in *B. subtilis* und *C. acetobutylicum* erkennen und postulieren zu können.

3.1.1 Nicht radioaktive „primer extension“-Experimente

Um den Transkriptionsstartpunkt von *spo0A* bestimmen zu können, wurden zuerst nicht radioaktive „primer extension“ (PEX)- und Sequenzieranalysen am automatischen Sequenziergerät Li-COR® 4000L (s. 2.10.1.1; 2.8.5) durchgeführt. Die dafür notwendige RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums von *C. acetobutylicum* in statischer Kultur isoliert (s. 2.4.3). Das Wachstum der Bakterien erfolgte in MES-Medium, in Volumina von 500 ml bis 1 l (s. 2.2.2.1). In Abbildung 5 ist der typische Verlauf von pH und OD₆₀₀ während des Wachstums von *C. acetobutylicum* in statischer Kultur zu sehen. Die optische Dichte erreichte hier nach 30 h Inkubation einen maximalen Wert von ungefähr 4, woraufhin die Kultur in die stationäre Phase überging. An diesem Punkt, d. h. bei einem pH-Wert von ca. 4,9, ist der Wechsel von der Säure- zur Lösungsmittelphase anzusetzen. Dieser Wert ist abgeleitet aus mehreren voneinander unabhängigen, gaschromatographischen Untersuchungen des Produktspektrums von *C. acetobutylicum* während des Wachstums in statischer Kultur (Daten nicht gezeigt). Der pH sankt allgemein von einem anfänglichen Wert von ca. 7 stetig auf 4,7 ab. Dieser letzte Wert symbolisiert das Ende der Beobachtung des Wachstums.

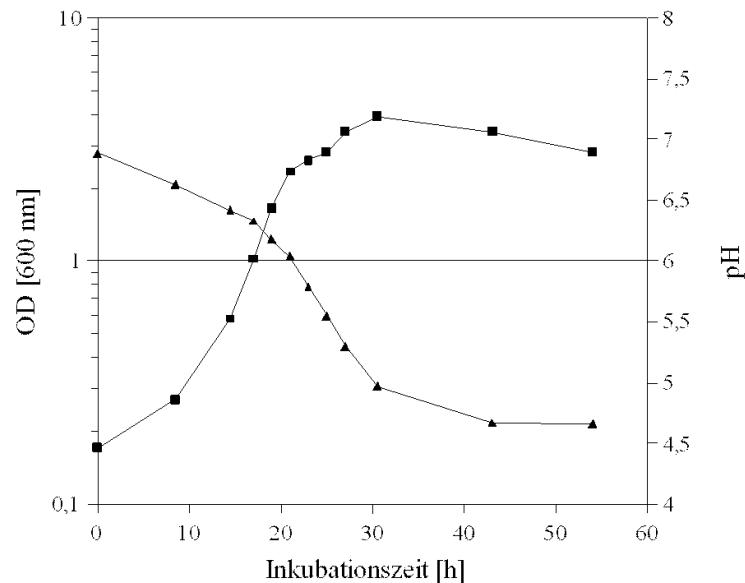


Abbildung 5: Wachstum von *C. acetobutylicum* in statischer Kultur. Dargestellt ist der Verlauf von OD₆₀₀ und pH während 43stündiger Inkubation in MES-Medium. ■ = OD₆₀₀; ▲ = pH. Dieser Wachstumsverlauf ist repräsentativ für insgesamt 4 Wachstumsversuche von *C. acetobutylicum* in statischer Kultur.

Für die Sequenzierreaktionen wurde das Plasmid pUC18-2071 verwendet, das die intergene Region zwischen *spoIVB* und *spo0A* als 608 Bp großes *SalI*/*SalI*-Fragment trägt. Hierfür wurde der intergene Bereich mit den „primer“ 2071_fw-*SalI* und 2071_rev-*SalI* (Nr. 1 und 2 aus Tab. 3) amplifiziert (s. 2.8.1), wobei durch die Wahl der „primer“ an beiden Seiten des Fragments jeweils eine *SalI*-Schnittstelle eingefügt wurde (s. 2.8.2). Anschließend konnte das Fragment in den mit *SalI* linearisierten und dephosphorylierten (s. 2.7.1, 2.7.2) Vektor pUC18 kloniert werden. In Abbildung 6 ist das für die Sequenzierreaktionen gebrauchsfertige Plasmid pUC18-2071 gezeigt.

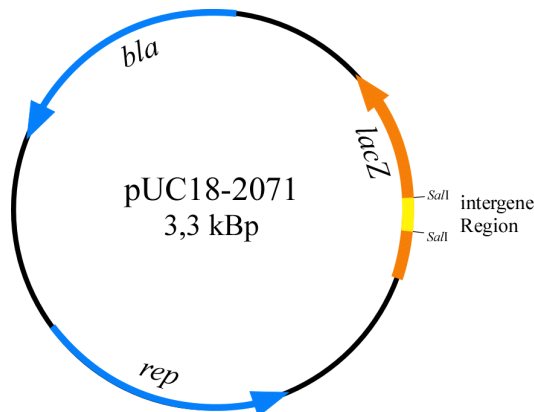


Abbildung 6: Plasmid pUC18-2071. Das Gen für die Ampicillinresistenz (*bla*) und der Replikationsursprung (*rep*) des Plasmids sind als blaue Pfeile gekennzeichnet. Das für eine Blau-Weiß-Selektion notwendige *lacZ*-Gen ist als orange-farbener Pfeil angezeigt, in dessen MKS die intergene Region zwischen *spoIVB* und *spo0A* als gelbes *SalI/SalI*-Fragment eingezeichnet ist.

Die nicht radioaktiven PEX- und Sequenzierreaktionen wurden unter Verwendung der „primer“ cac2071-ird-pe und 2071-IRD-PE-2 (Nr. 3 und 4 aus Tab. 3), wie in 2.8.5 und 2.10.1.1 beschrieben, am Li-COR® 4000L durchgeführt und ausgewertet. In Abbildung 7 ist lediglich ein kleiner Ausschnitt eines mit nicht radioaktiven Sequenzier- und „primer extension“-Reaktionen beladenen, 6%igen Polyacrylamidgels dargestellt, da die zu erkennenden PEX-Signale mit beiden oben genannten Oligonukleotiden in mehreren voneinander unabhängigen Versuchen immer nur an einer Position auftraten, demnach also nur einen Transkriptionsstartpunkt signalisierten. Bei diesem Transkriptionsstartpunkt handelt es sich um den 164 Bp stromaufwärts des *spo0A*-Startkodons lokalisierten Startpunkt, dessen abgeleitete -10- und -35-Regionen Ähnlichkeit zu σ^A -abhängigen Promotoren aufweist (vgl. Abb. 4). Sehr schwache Signale sind in den Spuren 1 und 2, also in der logarithmischen Phase nach 14,5 bzw. 17 h Inkubation, zu erkennen. Die Signale in den Spuren 3-7 werden zum Ende hin zunehmend stärker. Diese Reaktionen waren mit RNA aus der logarithmischen Phase erzeugt worden, wobei die Spur 7 mit nach 27ständiger Inkubation isolierter RNA das Ende der logarithmischen Phase angibt. In den Spuren 9-10, d. h. in der stationären Phase, ist das Signal verschwunden. Ab diesem Zeitpunkt wird *spo0A* demnach nicht mehr von diesem Startpunkt aus transkribiert.

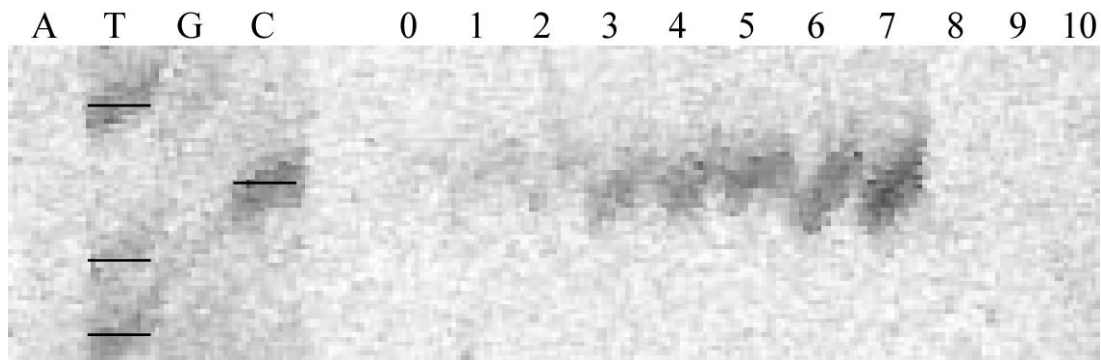


Abbildung 7: Bestimmung der 5'-Enden von *spo0A*-mRNA Fragmenten mittels nicht radioaktiver „primer extension“-Experimente. Neben den ebenfalls mit dem Oligonukleotid cac2071-ird-pe hergestellten Sequenzierreaktionen (A T G C) sind die „primer extension“-Reaktionen aufgetragen, die mit Gesamt-RNA aus einem statischen Wachstumsversuch (vgl. Abb. 5) von *C. acetobutylicum* durchgeführt worden waren. Die RNA wurde hierfür zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums isoliert: 0: Zeitpunkt 0 direkt nach Animpfen der Hauptkultur; 1: nach 14,5 h Inkubation; 2: nach 17 h; 3: nach 19 h; 4: nach 21 h; 5: nach 23 h; 6: nach 25 h; 7: nach 27 h; 8: nach 30,5 h; 9: nach 43 h; 10: nach 54 h. Dieses Ergebnis steht stellvertretend für die Ergebnisse aus mehreren voneinander unabhängigen Versuchen, die mit den „primer“ cac2071-ird-pe und 2071-IRD-PE-2 und isolierter RNA aus drei verschiedenen statischen Wachstumsversuchen mit *C. acetobutylicum* durchgeführt worden waren.

Der Versuch, die drei postulierten Startpunkte mit dem von Concha Hollergschwandner verwendeten Oligonukleotid Primex0A-ird-pe (Nr. 5 in Tab. 3) in nicht radioaktiven „primer extension“-Experimenten zu bestätigen, war nicht aussagekräftig. Zwar konnte der Transkriptionsstartpunkt 164 Bp vor dem Translationsstart von Spo0A gefunden werden, allerdings traten zusätzlich zu viele andere Signale auf, die auf unspezifische Bindung des Oligonukleotids hindeuteten.

Infolge der schlechten Bildqualität und der Tatsache, dass nur einer der drei postulierten Startpunkte verifiziert werden konnte, sollten im Weiteren radioaktive Sequenzier- und „primer extension“-Analysen durchgeführt werden.

3.1.2 Radioaktive Durchführung von „primer extension“-Experimenten

Auf Grund der höheren Sensitivität bei der Detektion von radioaktiv markierten Reaktionen erfolgten daraufhin die Sequenzier- und PEX-Reaktionen mit radioaktiver Markierung (s. 2.8.6, 2.10.1.2). Die RNA für diese Versuche wurde erneut aus Kulturproben isoliert (s. 2.4.3), die zu bestimmten Zeitpunkten während des Wachstums von *C. acetobutylicum* in statischer Kultur (vgl. Abb. 5) abgenommen worden waren. Auch hier diente das Plasmid pUC18-2071 (vgl. Abb. 6) als Matrize für die Sequenzierreaktionen (s. 2.8.6), die, wie auch die „primer extension“-Reaktionen (s. 2.10.1.2), mit den Oligonukleotiden 2071-start-1, 2071-start-2, 2071-start-5 und 2071-start-6 (Nr. 6, 7, 9, 10 in Tab. 3) hergestellt wurden. In Abbildung 8 ist das Ergebnis von radioaktiv durchgeführten Sequenzier- und PEX-Analysen unter Verwendung des „primer“ 2071-start-2 beispielhaft dargestellt. Alle anderen verwendeten Oligonukleotide lieferten keine oder zu viele unspezifische Signale. Nachfolgende Abbildung 8 lässt deutlich an zwei verschiedenen Stellen der Sequenzierreaktionen Signale erkennen, die demnach für zwei verschiedene Transkriptionsstartpunkte stehen. Das oberste der beiden Signale ist beinahe in allen Spuren, d. h. während des gesamten Wachstums mit schwankender Intensität sichtbar. Dabei ist zu erkennen, dass die Intensitäten von Spur 2 bis Spur 7 stetig stärker werden und anschließend wieder abnehmen, bevor in Spur 11 erneut ein sehr starkes Signal zu erkennen ist. Dies spiegelt die zunächst geringe Expression von *spo0A* wieder, die zu Beginn der logarithmischen Phase beginnt. Am Anfang der stationären Phase, d. h. beim Umschalten von Säure- auf Lösungsmittelproduktion, und auch während der stationären Phase werden hohe Mengen an für die Sporulation nötigem Regulatorprotein benötigt. Dies wird durch die sehr starken Signale in Spur 7 (25,5 h Inkubation) und 11 (33,5 h Inkubation) deutlich. Die Spuren 1 und 10 lassen sehr schwache Signale erahnen. Spur 1 entspricht der Kultur direkt nach dem Animpfen, so dass es sich hier um Artefakte aus der gut gewachsenen Vorkultur handelt. Bei Spur 10 bestanden Schwierigkeiten beim Beladen des Gels, was Ursache für das schwache Signal sein kann.

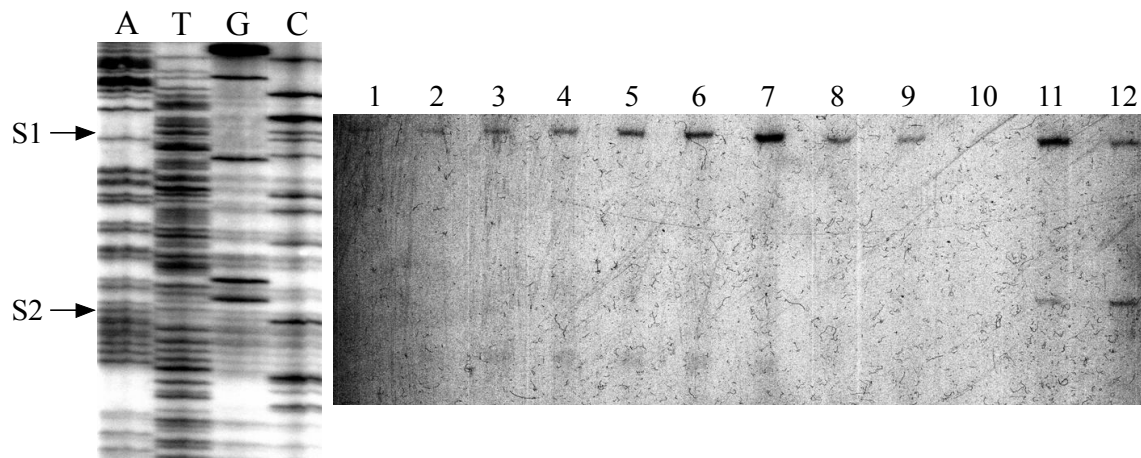


Abbildung 8: Bestimmung der 5'-Enden von *spo0A*-mRNA Fragmenten mittels radioaktiver „primer extension“-Experimente. Neben den ebenfalls mit dem Oligonukleotid 2071-start-2 hergestellten Sequenzierungsreaktionen (A T G C) sind die „primer extension“-Reaktionen aufgetragen, die mit Gesamt-RNA aus einem statischen Wachstumsversuch von *C. acetobutylicum* durchgeführt worden waren. Die RNA wurde hierfür zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums isoliert: Spur 1: Zeitpunkt 0 direkt nach Animpfen der Hauptkultur; Spur 2: nach 15,5 h Inkubation; Spur 3: nach 17,5 h; Spur 4: nach 19,5 h; Spur 5: nach 21,5 h; Spur 6: nach 23,5 h; Spur 7: nach 25,5 h; Spur 8: nach 27,5 h; Spur 9: nach 29,5 h; Spur 10: nach 31,5 h; Spur 11: nach 33,5 h; Spur 12: nach 43 h. Dieses Ergebnis steht stellvertretend für die Ergebnisse aus mehreren voneinander unabhängigen Versuchen, die mit dem „primer“ 2071-start-2 und isolierter RNA aus zwei verschiedenen statischen Wachstumsversuchen mit *C. acetobutylicum* durchgeführt worden waren.

Bei dem obersten Signal (im folgenden als S1 bezeichnet) handelt es sich um den postulierten und bereits mit nicht radioaktiven „primer extension“-Experimenten (vgl. Abb. 7) bestätigten Startpunkt, der 164 Bp vor dem Startkodon von *spo0A* liegt und dessen abgeleitete -10- und -35-Regionen Ähnlichkeit zu σ^A -abhängigen Promotoren zeigen. Das in Abbildung 8 als S2 bezeichnete Signal tritt erst in den Spuren 11 und 12, also erst in der stationären Phase auf, wobei die Intensität des Signals in Spur 12 stärker ist als in Spur 11. Dieses Signal steht für einen potentiellen zweiten Startpunkt, der 106 Bp stromaufwärts des Translationsstarts von Spo0A angesiedelt ist.

Um die erhaltenen Transkriptionsstartpunkte S1 und S2 in Zusammenhang mit den postulierten Startpunkten zu bringen und um sich ihre Lage in der intergenen Region zwischen *spoIVB* und *spo0A* bzw. die abgeleiteten -10- und -35-Regionen besser vorstellen zu können, sind in nachstehender Abbildung 9 nochmals alle bis hierhin erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Die Existenz von S1, dessen -10- und -35-Region einen σ^A -Konsensus

aufweisen, scheint als sicher, da dieser Startpunkt in jedem der bisher durchgeführten Experimente identifiziert werden konnte. Wie allerdings aus Abbildung 9 ersichtlich ist, zeigen auch die von S2 abgeleiteten -10- und -35-Regionen Ähnlichkeit zu σ^A -abhängigen Promotoren. Zwar scheint die Transkription von *spo0A* von diesem Startpunkt aus erst in der stationären Phase zu erfolgen. Falls jedoch eine Ähnlichkeit in dem Transkriptionsmuster von *spo0A* in *B. subtilis* und *C. acetobutylicum* besteht, sollte es sich in der stationären Phase um einen Transkriptionsstartpunkt mit σ^H -abhängigem Konsensus handeln.

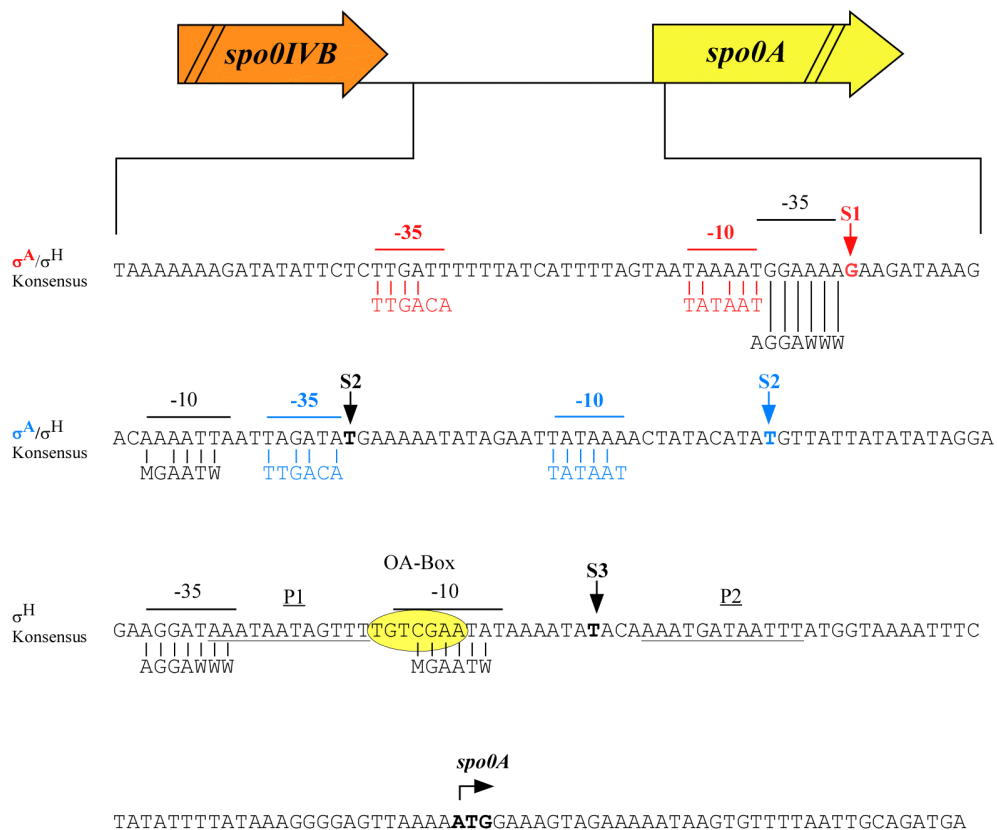


Abbildung 9: Lage der postulierten und im Rahmen der vorliegenden Arbeit bisher erhaltenen Transkriptionsstartpunkte von *spo0A* in der intergenen Region zwischen *spoIVB* und *spo0A*. Schematisch dargestellt ist die intergene Region zwischen *spoIVB* und *spo0A* und auszugsweise die Sequenz, die alle Transkriptionsstartpunkte und die dazu abgeleiteten -10- und -35-Regionen beinhaltet. Die verschiedenen Startpunkte sind mit Pfeilen gekennzeichnet und farbig hervorgehoben. rot: in allen Experimenten auftretender S1; schwarz: Startpunkte, die bisher nur von C. Hollergschwandner [Hollergschwandner, 2003] erhalten wurden; blau: der in der vorliegenden Arbeit mit radioaktiven PEX- und Sequenzierreaktionen identifizierte S2. Der Translationsstart von Spo0A ist ebenfalls mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Palindrome sind unterstrichen und die putative OA-Box ist eingekreist. W = A, T; M = A, C.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass nicht nur die Detektionsmethode, sondern auch die Art und Weise der Kultivierung von *C. acetobutylicum* einen Einfluss auf die Identifizierung verschiedener Startpunkte haben könnte, sollte in weiteren radioaktiven Experimenten RNA aus einer kontinuierlichen Kultur von *C. acetobutylicum* (s. 2.2.2.2) verwendet werden. Für die Isolierung der Gesamt-RNA (s. 2.4.3) wurden mehrere Wachstumsversuche im Fermenter mit *C. acetobutylicum* vorgenommen. In der folgenden Abbildung 10 ist das Wachstum von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur nach Abschalten der pH-Kontrolle dargestellt.

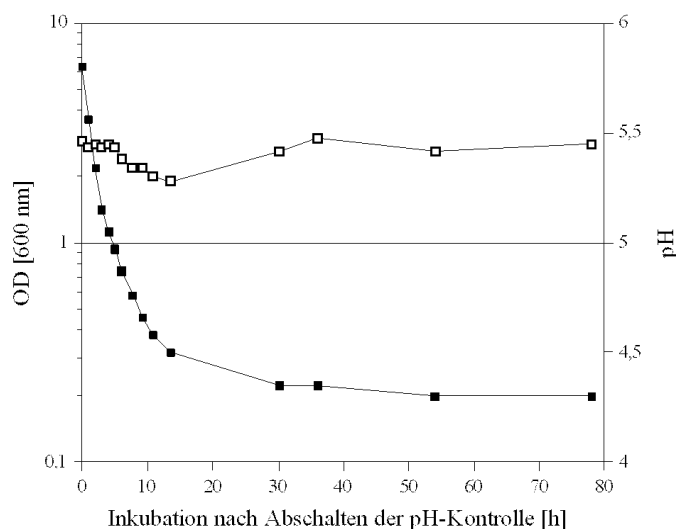


Abbildung 10: Wachstum von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur. Dargestellt sind der Verlauf von OD₆₀₀ (□) und pH (■) während 78stündiger Inkubation der Kultur nach Abschalten der pH-Kontrolle zum Zeitpunkt 0. Vor dem Zeitpunkt 0 wurden der pH-Wert durch 4 M KOH bei 5,8 und der Wert für die OD₆₀₀ durch kontinuierliche Zufuhr von neuem und Ablauf von verbrauchtem Medium bei ca. 3 konstant gehalten. Dieser Wachstumsverlauf ist repräsentativ für insgesamt 3 Wachstumsversuche von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur. (Zugehöriges Produktspektrum s. Abb. 11).

Erwartungsgemäß fiel der pH-Wert nach Abschalten der Kontrolle durch KOH kontinuierlich ab, wobei nach ca. 30 h Inkubation ein Wert von 4,3 erreicht wurde, der sich auch bis zum Ende nach 78stündiger Inkubation nicht mehr änderte. Die OD₆₀₀ blieb mit leichten Schwankungen zwischen den Werten 2 und 3 konstant. Durch Wiedereinschalten der pH-Kontrolle auf einen Wert von 5,8 „erholte“ sich die Kultur wieder und konnte so erneut in die

logarithmische Phase versetzt werden, so dass nach einigen Tagen ein neuer Wachstumsversuch durch Abschalten der pH-Kontrolle gestartet werden konnte.

Zusätzlich zu pH und OD₆₀₀ wurde auch das Produktspektrum von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur bestimmt. Hierzu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Wachstum Proben entnommen (s. 2.2.2.2) und analog zu 2.2.3.3 gaschromatographisch untersucht.

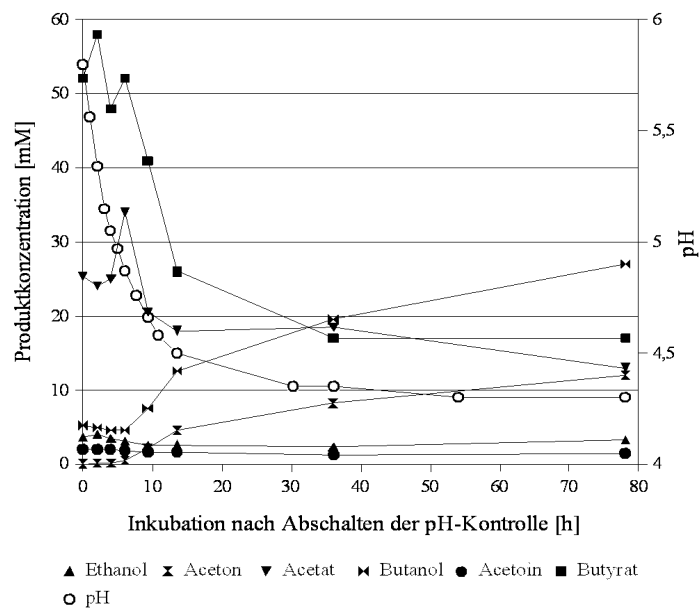


Abbildung 11: Produktspektrum im Verlauf des Wachstums von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur. Dargestellt sind die Produktkonzentrationen in mM und der Verlauf des pH während 78stündiger Inkubation der Kultur nach Abschalten der pH-Kontrolle zum Zeitpunkt 0. Dieses Spektrum ist repräsentativ für die Bestimmung der Produktkonzentrationen aus insgesamt zwei Wachstumsversuchen im Fermenter mit jeweiliger Doppelbestimmung.

Der Verlauf der Produktkonzentrationen, der in Abbildung 11 zu sehen ist, ist charakteristisch für das Wachstum von *C. acetobutylicum*. Zu Beginn des zweiphasigen Fermentationsstoffwechsels wurden die Säuren Acetat und Butyrat bis zu einer Konzentration von 35 bzw. 58 mM produziert. Mit Erreichen eines pH-Wertes von ca. 4,8 nach ungefähr 7stündiger Inkubation der Kultur nach Abschalten der pH-Kontrolle schaltete der Organismus von Säure- auf Lösungsmittelbildung um. Jetzt wurden aus den vorher gebildeten Säuren und verbliebenem Substrat die Lösungsmittel Aceton und Butanol bis zu einer Endkonzentration

von 12 bzw. 27 mM gebildet. Die Werte für Ethanol schwankten während des gesamten Wachstums zwischen 2,5 und 4 mM, die von Acetoin waren im Bereich zwischen 1,3 und 2 mM angesiedelt.

Nachdem aus den abgenommenen Kulturproben Gesamt-RNA isoliert worden war (s. 2.4.3), konnten Sequenzier- und „primer extension“-Experimente mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden 2071-start-1, -2, -5, -6, 2071-2-neu, 2071-7-neu und Primex0A (Nr. 6-12 in Tab. 3) durchgeführt werden (2.8.6, 2.10.1.2). Nur mit den „primer“ 2071-start-2 bzw. 2071-2-neu wurden eindeutige Ergebnisse erzielt. Bei der Verwendung der anderen Oligonukleotide traten trotz identischer Anwendung und Durchführung der Methode entweder keine oder zu viele unspezifische Signale auf. Das Plasmid pUC18-2071 (vgl. Abb. 6) diente erneut als Matrize für die Sequenzierreaktionen.

Wie in folgender Abbildung 12 zu sehen ist, konnten in „primer extension“-Analysen mit radioaktiver Markierung der „primer“ und unter Verwendung von RNA, die während eines kontinuierlichen Wachstums von *C. acetobutylicum* isoliert worden war, insgesamt an 9 verschiedenen Stellen der Sequenzierreaktionen Signale identifiziert werden. Das oberste Signal repräsentiert den bisher in allen Experimenten identifizierten Transkriptionsstartpunkt S1 164 Bp vor dem Startkodon von *spo0A*. Die Transkription von *spo0A* von diesem Startpunkt aus beginnt laut Abbildung 12 bereits in der logarithmischen Phase nach ca. 3-4 h nach Abschalten der pH-Kontrolle und hält bis zum Ende des Wachstums an, wobei nach ca. 11 h eine deutliche Zunahme der Signalintensität zu beobachten ist. 30 h nach Abschalten der pH-Kontrolle (Spur 12), d. h. in der stationären Phase, ist das Signal am stärksten, verliert aber bis zum Ende des Wachstums hin wieder an Stärke. In Spur 12 sind auch alle anderen Signale zu erkennen. Die Expression von diesen potentiellen Startpunkten aus hält allerdings nur etwa 7 h an. Das blau eingefärbte und mit S2 betitelte Signal meint den in der vorliegenden Arbeit bereits mit RNA-Proben aus statischem Wachstum und radioaktiven Experimenten erhaltenen zweiten σ^A -abhängigen Startpunkt (vgl. Abb. 8, 9). Erstaunlicherweise konnte in dem vorliegenden Experiment zum ersten mal der dritte, von Concha Hollergschwandner postulierte und σ^H -abhängige Transkriptionsstartpunkt S3 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4). Die nur mit Pfeilen gekennzeichneten Signale weisen gleich starke oder sogar stärkere Intensitäten auf als S1-S3, traten jedoch in diesem Experiment zum ersten und einzigen mal auf und stellen deshalb vermutlich Degradationsprodukte der mRNA dar.

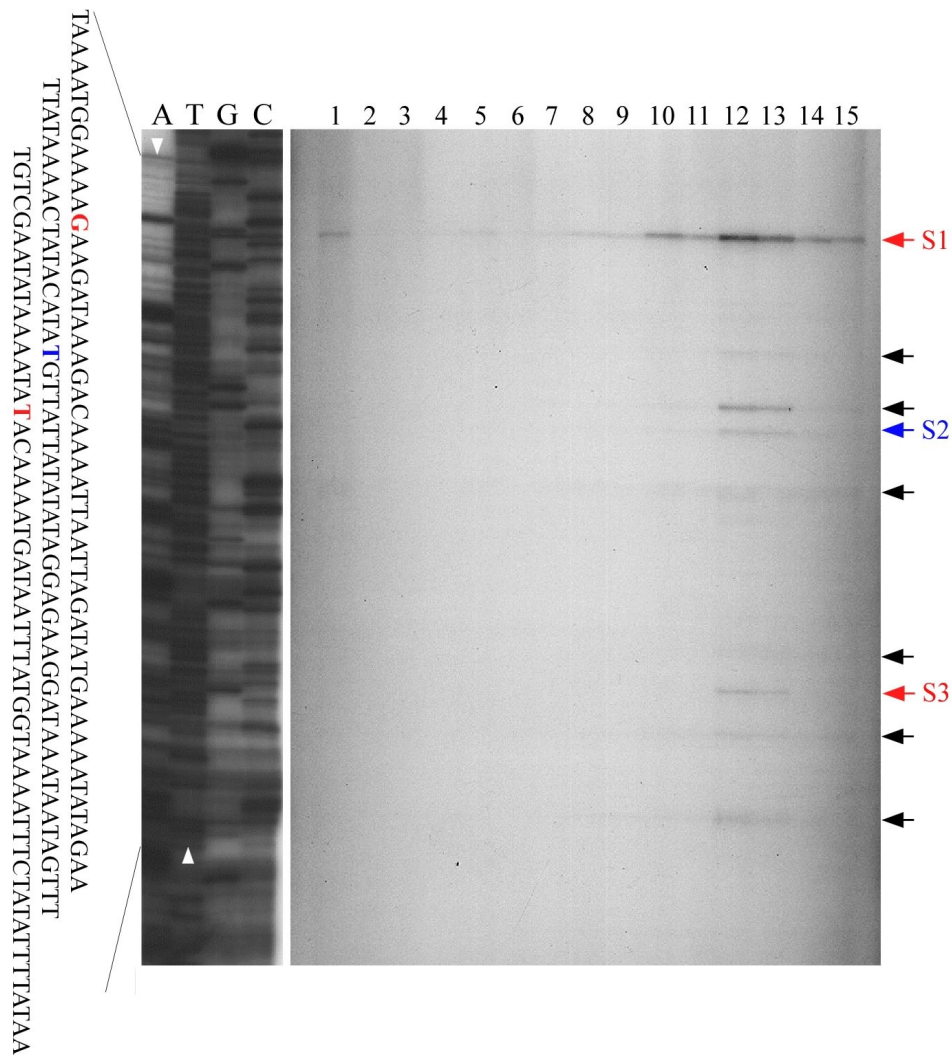


Abbildung 12: Bestimmung der 5'-Enden von *spo0A*-mRNA Fragmenten mittels „primer extension“-Experimente und radioaktiver Markierung. Neben den ebenfalls mit dem Oligonukleotid 2071-2-neu hergestellten Sequenzierreaktionen (A T G C) sind die „primer extension“-Reaktionen aufgetragen, die mit Gesamt-RNA aus einem Wachstumsversuch von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur (vgl. Abb. 10, 11) durchgeführt worden waren. Die RNA wurde hierfür zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums isoliert. Spur 1: Zeitpunkt 0 direkt nach Abschalten der pH-Kontrolle; Spur 2: 1 h nach Abschalten; Spur 3: 2 h; Spur 4: 3 h; Spur 5: 4 h; Spur 6: 5 h; Spur 7: 6 h; Spur 8: 7,75 h; Spur 9: 9,25 h; Spur 10: 10,75 h; Spur 11: 13,5 h; Spur 12: 30,25 h; Spur 13: 36 h; Spur 14: 54 h; Spur 15: 78 h. Links neben dem Bild ist der relevante Sequenzbereich (im Gel mit weißen Pfeilen markiert) zur Verdeutlichung schematisch dargestellt. Alle Bereiche, in denen Signale erkannt wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet: rot: die durch vorliegende Arbeit verifizierten und postulierten Startpunkte S1 und S3; blau: der in der vorliegenden Arbeit identifizierte S2; schwarz: zusätzlich auftretende, unbekannte Signale. Dieses Ergebnis steht stellvertretend für die Ergebnisse aus mehreren voneinander unabhängigen Versuchen, die mit 2071-start-2 bzw. 2071-2-neu und isolierter RNA aus zwei verschiedenen kontinuierlichen Wachstumsversuchen mit *C. acetobutylicum* durchgeführt worden waren.

3.1.3 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels „5'-RACE“

Um die erhaltenen Transkriptionsstartpunkte von *spo0A* auf andere Art und Weise erneut zu bestätigen, wurde die Methode der „5'-RACE“ („RACE: rapid amplification of cDNA ends“, s. 2.10.2) verwendet. Diese Methode stellt eine schnelle und vor allem Radioaktivität-freie Alternative zur Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten dar.

Die Methode sollte zuerst mit einer RNA-Probe getestet werden. Hierfür wurde RNA aus dem Wachstumsversuch von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur (vgl. Abb. 10) verwendet. Speziell für den Nachweis von S3, der bis hierhin nur ein einziges mal identifiziert werden konnte (vgl. Abb. 12), wurde die RNA aus Proben isoliert (s. 2.4.3), die 36 h nach Abschalten der pH-Kontrolle entnommen worden waren. Die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von *spo0A* mit der Methode der 5'-RACE wurde analog zu 2.10.2 durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „primer“ cDNArev1 (Nr. 13 aus Tab. 3), der 453 Bp nach dem Translationsstart von Spo0A im Gen band. Mit den Oligonukleotiden cDNArev2 und cDNArev3 (banden 401 Bp bzw. 366 Bp nach dem Startkodon im Gen *spo0A*, Nr. 14 und 15 aus Tab. 3) wurde die zweite bzw. die sich daran anschließende dritte „nested“-PCR durchgeführt.

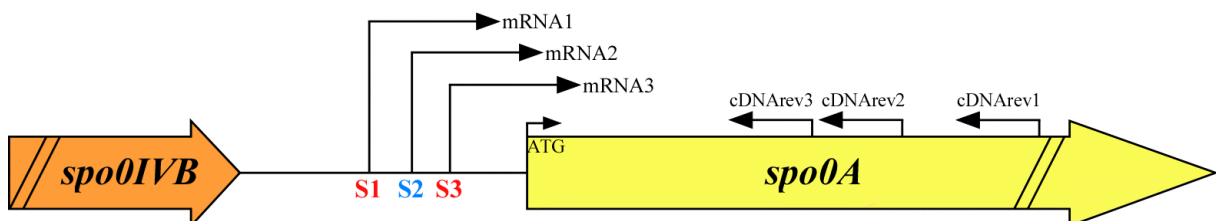


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *spo0A* mittels „5'-RACE“. Schematisch dargestellt ist die intergene Region zwischen *spoIVB* und *spo0A* mit den drei potentiellen Transkriptionsstartpunkten (rot: S1 und S3, konnten bereits in PEX- und Sequenzierreaktionen verifiziert werden, die nicht radioaktiv und mit radioaktiver Markierung durchgeführt worden waren; blau: der in der vorliegenden Arbeit identifizierte S2). Mit Pfeilen angezeigt sind die Bindepositionen der drei verschiedenen sequenzspezifischen „primer“ cDNArev1-3, der Translationsstartpunkt von Spo0A und die möglichen mRNAs.

Mit dieser Methode konnten 36 h nach Abschalten der pH-Kontrolle, also in der Lösungsmittelphase (vgl. Abb. 10) nur die bereits aus „primer extension“-Experimenten mit radioaktiver Markierung bekannten Transkriptionsstartpunkte S1 (σ^A -abhängig) und S3 (σ^H -abhängig) bestätigt werden (vgl. Abb. 12). Der ebenfalls σ^A -abhängige, in der vorliegenden

Arbeit mit radioaktiven PEX- und Sequenzierreaktionen identifizierte Startpunkt S2 (vgl. Abb. 8, 12) konnte mit dieser Methode nicht verifiziert werden.

Die Wiederholung des Experiments mit isolierter RNA aus Proben, die 2 h, 4 h, 6 h, 9,25 h, 13,5 h, 30,25 h und 78 h nach Abschalten der pH-Kontrolle abgenommen worden waren (vgl. Abb. 10) lieferte kein eindeutiges Ergebnis.

Die Ergebnisse aus „primer extension“- und Sequenzierreaktionen, die nicht radioaktiv und mit radioaktiver Markierung durchgeführt worden waren und die Ergebnisse, die mittels 5'-RACE erhalten worden waren, bestätigen zusammengekommen die Existenz eines σ^A -abhängigen Transkriptionsstartpunktes, der während des vegetativen Wachstums von *C. acetobutylicum* aktiv zu sein scheint. Dadurch wird die Menge an Spo0A konstitutiv niedrig gehalten. In der stationären Phase kommt, wie aus Abb. 12 zu erkennen ist, ein σ^H -abhängiger Promoter hinzu, der dann, wie auch aus *B. subtilis* bekannt, hohe Mengen an für die Sporulation nötigem Regulatorprotein gewährleisten könnte.

3.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *ptb* aus *Clostridium acetobutylicum*

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *ptb-buk*-Operons sollte als Positivkontrolle für die radioaktiven „primer extension“- und Sequenzierreaktionen zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *spo0A* dienen.

Das *ptb-buk*-Operon aus *C. acetobutylicum* kodiert für die Phosphotransbutyrylase und die Butyratkinase. Diese Enzyme sind für die Bildung von Butyrat aus Butyryl-CoA über Butyrylphosphat verantwortlich. Promoterstudien haben gezeigt, dass die Transkription zu Beginn des Wachstums startet und beim Eintritt in die stationäre Phase, also beim Umschalten von Säure- auf Lösungsmittelproduktion nahezu vollständig reprimiert wird [Feustel, 2004. Walter et al. hatten bereits im Jahr 1993 das für die Butyratbildung verantwortliche *ptb-buk*-Operon untersucht und den Transkriptionsstartpunkt und die dazu abgeleiteten -10- und -35-Regionen bestimmt. Sie lokalisierten den Transkriptionsstart (S_{ptb}) 57 Bp vor dem Translationsstart von Ptb [Walter et al., 1993].

Für die radioaktiv markierten Sequenzierreaktionen, die analog zu 2.8.6 mit dem Oligonukleotid *ptb*-start-neu (Nr. 16 aus Tab. 3) durchgeführt wurden, wurde das Plasmid pJC7 (Stammsammlung AG Dürre Nr. 12) verwendet, das das *ptb-buk*-Operon und die dazugehörige Promoterregion enthält. Die RNA für die PEX-Versuche wurde aus Kulturproben isoliert (s. 2.4.3), die zu Beginn der logarithmischen Phase des Wachstums von

C. acetobutylicum in kontinuierlicher Kultur, d. h. 1-4 h nach Abschalten der pH-Kontrolle (vgl. Abb. 10) entnommen worden waren. PEX-Reaktionen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden wurden, wie in 2.10.1.2 beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in folgender Abbildung 14 am Beispiel einer RNA-Probe, die 2 h nach Abschalten der pH-Kontrolle isoliert worden war, dargestellt.

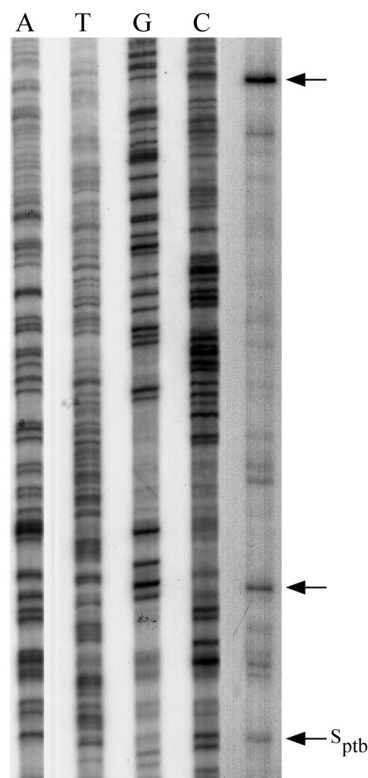


Abbildung 14: Bestimmung des 5'-Endes von *ptb*-mRNA Fragmenten mit Hilfe von „primer extension“-Experimenten mit radioaktiv markierten „primer“. Neben den ebenfalls mit dem Oligonukleotid *ptb*-start-neu hergestellten Sequenzierreaktionen (A T G C) ist die „primer extension“-Reaktion aufgetragen, die mit Gesamt-RNA durchgeführt wurde, die 2 h nach Abschalten der pH-Kontrolle aus Proben eines Wachstumsversuches von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur (vgl. Abb. 10, 11) isoliert worden war. Der bereits veröffentlichte Startpunkt S_{ptb} sowie zwei stärkere Signale sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Dieses Ergebnis steht stellvertretend für die Ergebnisse aus mehreren voneinander unabhängigen Versuchen, die mit dem „primer“ *ptb*-start-neu und mit aus der logarithmischen Phase isolierter RNA durchgeführt worden waren. Dabei handelte es sich um RNA aus zwei verschiedenen kontinuierlichen Wachstumsversuchen von *C. acetobutylicum*.

Wie Abbildung 14 zu entnehmen ist, zeigten sich neben dem bereits veröffentlichten Transkriptionsstartpunkt S_{ptb} [Walter et al., 1993] zwei wesentlich stärkere Signale 89 Bp und 333 Bp vor dem Translationsstart von Ptb. Zur Übersicht sind die ermittelten potentiellen Transkriptionsstartpunkte und deren abgeleitete -10- und -35-Regionen zusammen mit dem bereits bekannten Startpunkt in der Promoterregion des *ptb-buk*-Operons in Abbildung 15 zusammengestellt.

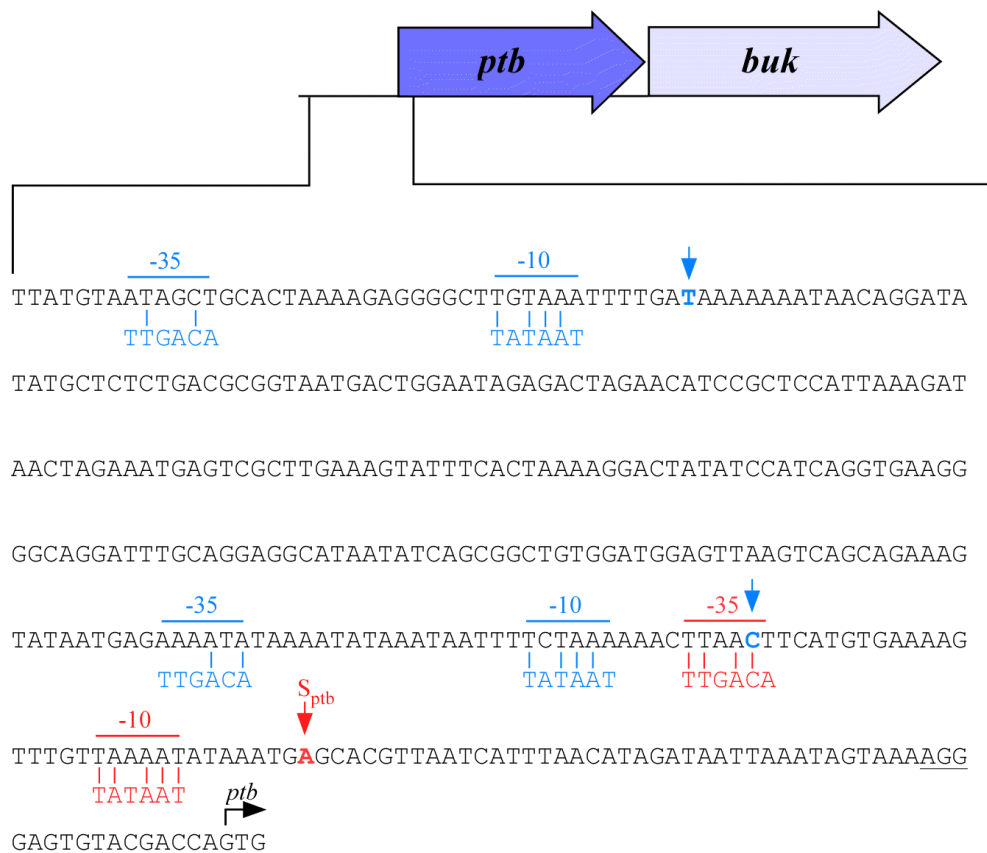


Abbildung 15: Lage des bereits bekannten und der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Transkriptionsstartpunkte von *ptb* in der Promoterregion des *ptb-buk*-Operons. Schematisch dargestellt ist die Promoterregion des *ptb-buk*-Operons und auszugsweise die Sequenz, die alle Transkriptionsstartpunkte und die dazu abgeleiteten -10- und -35-Regionen beinhaltet. Die verschiedenen Startpunkte sind farblich und mit Pfeilen hervorgehoben. rot: veröffentlichter Startpunkt S_{ptb} [Walter et al., 1993]; blau: die in der vorliegenden Arbeit mit radioaktiven PEX- und Sequenzierreaktionen identifizierte Signale 89 Bp bzw. 333 Bp vor dem Startkodon von *ptb*. Der Translationsstart GTG von Ptb ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Ribosomenbindestelle ist unterstrichen.

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass die beiden zusätzlichen potentiellen Startpunkte des *ptb-buk*-Operons 89 bzw. 333 Bp vor dem Translationsstart von Ptb zwar -10-Regionen mit 66 % Übereinstimmung zum -10-Konsensus TATAAT aufweisen. Andererseits zeigen beide abgeleiteten -35-Regionen nur eine etwa 33%ige Übereinstimmung zur -35-Konsensussequenz TTGACA. Die beiden zusätzlichen Signale können also auch Folge einer RNA-Prozessierung darstellen. Gewissheit würde die Verwendung eines weiteren Oligonukleotids zur Herstellung radioaktiver „primer extension“- und Sequenzierreaktionen bringen.

3.3 Untersuchung der Promoterregion von *spo0A* mit einem Luciferase-Reportergen-System

Die nichttranslatierte stromaufwärts liegende Region von *spo0A* weist interessante Sequenzen auf, deren Funktion bisher noch nicht vollständig geklärt ist. Dabei handelt es sich um zwei 12 Bp lange palindromische Sequenzen mit den Basenfolgen AAATAATAGTTT (Palindrom 1 bzw. P1) und AAATGATAATTT (Palindrom 2 bzw. P2), die sich allerdings in 2 Basen unterscheiden. Die beiden Palindrome sind vor und nach der putativen OA-Box im Abstand von 20 Nukleotiden lokalisiert.

Um den Einfluss dieser Sequenzen auf die Expression von *spo0A* zu untersuchen, war bereits das erste Palindrom stromaufwärts der OA-Box in einer früheren Arbeit von Concha Hollergschwandner [Hollergschwandner, 2003] mittels SOE-PCR mutiert worden. Anschließend wurde der mutierte Promoterbereich in den Reportertestvektor pLucBF kloniert, der eine Untersuchung des Promoterbereiches über die Expression der Luciferase ermöglicht. Im Vergleich zu einem, die Wildtyp-Promotersequenz von *spo0A* enthaltenden, Reportergenplasmid konnte gezeigt werden, dass die Expression von *spo0A* schon zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase beginnt. Noch während der exponentiellen Phase wird das Gen abgeschaltet. Bei der Regulation dieses Vorgangs scheint das Palindrom 1, an welches direkt die OA-Box des Promoterbereichs von *spo0A* anschließt, einen Einfluss zu haben. Durch den gezielten Basenaustausch und das dadurch zerstörte Palindrom 1 konnte ein positiver Effekt auf die Expression des *spo0A*-Gens festgestellt werden, da die Expression des Reportergens sowohl stärker war, als auch zeitlich länger andauerte. Dies wurde als Hinweis für eine Reprimierung des *spo0A*-Gens durch ein an das Palindrom 1 bindendes Regulatorprotein gedeutet [Hollergschwandner, 2003].

In der vorliegenden Arbeit sollte das zweite, stromabwärts der putativen 0A-Box gelegene P2 mutiert werden und ein eventueller Einfluss dieser Sequenz mit einem Luciferase-Reportergen-System untersucht werden.

Dieses System basiert auf dem *lucB*-Gen, das für die Luciferase des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kodiert. In einer vorangegangenen Arbeit von Lothar Feustel [Feustel, 2004] wurde das Gen ohne Promoterbereich mit dem Plasmid pBRluc als Matrize amplifiziert, wobei das Startkodon mit Hilfe des verwendeten forwards-„primer“ durch eine *SalI*-Schnittstelle ersetzt worden war. Der verwendete rückwärts-„primer“ fügte eine *PstI*-Schnittstelle ein. Es erfolgte die Klonierung des amplifizierten und restriktionsverdauten *lucB*-Gens in den gleichermaßen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pIMP1, der neben Resistenzgenen für Ampicillin und Erythromycin die Replikationsursprünge pMB1 *ori* ColE1 und *ori*(+) pIM13 für Gram⁻- und Gram⁺-Bakterien enthält. Der so entstandene Vektor wurde pLucBF genannt. Die Klonierung des zu testenden Promoterbereiches inklusive des Startkodons des nachfolgenden Gens stromaufwärts vor das promoterlose *lucB*-Gen ohne Startkodon ermöglicht so die Messung transkriptioneller Stärken und deren zeitlichen Verlaufs. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass ein Zellaliquot entnommen und direkt für die Messung der Lumineszenz benutzt werden kann. Somit wird eine zeitnahe Messung parallel zum entsprechenden Wachstumsversuch ermöglicht.

Für die Mutation von P2 wurde die Methode der SOE-PCR („splicing by overlap extension“-PCR; s. 2.8.3; [Ho et al., 1989]) herangezogen. Die 6fache Basensubstitution im Palindrom wurde unter Verwendung der inneren Mutagenese-„primer“ P2.2_F und P2.2_R (Nr. 24 und 25 aus Tab. 3) erreicht (Abb. 16 A). Zusammen mit den beiden äußeren Oligonukleotiden pLuc-BamHI und pLuc-SalI (Nr. 23 und 26 aus Tab. 3), die eine *Bam*HI bzw. eine *SalI*-Schnittstelle einfügten, wurden in einer ersten PCR die Fragmente F1 (375 Bp) und F2 (92 Bp) generiert (Abb. 16 B). In einer zweiten PCR nur mit dem äußeren „primer“-Paar wurden anschließend die Fragmente F1 und F2 zu einem einzigen Fragment F1+2mut (434 Bp) fusioniert und über TA-Klonierung in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] eingebracht. Zur Kontrolle in nachfolgenden Luciferase-Messungen wurde das Wildtyp-Promoterfragment F1+2wt ohne eine Mutation im P2 nur mit den äußeren Oligonukleotiden amplifiziert (434 Bp) und über TA-Klonierung in den Übergangsvektor pDRIVE[®] kloniert. Eine Sequenzierung (s. 2.8.7) beider Plasmide mit den allgemein für die Sequenzierung von PCR-Fragmenten im pDRIVE[®]- bzw. pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor verfügbaren Oligonukleotiden M13_fw und M13_rev bestätigte das Vorhandensein der richtigen Mutationen im P2 (F1+2mut) bzw. keine Mutation im P2 (F1+2wt) und die Richtigkeit der Schnittstellen für *Bam*HI am 5'- und *SalI* am 3'-Ende der Fragmente.

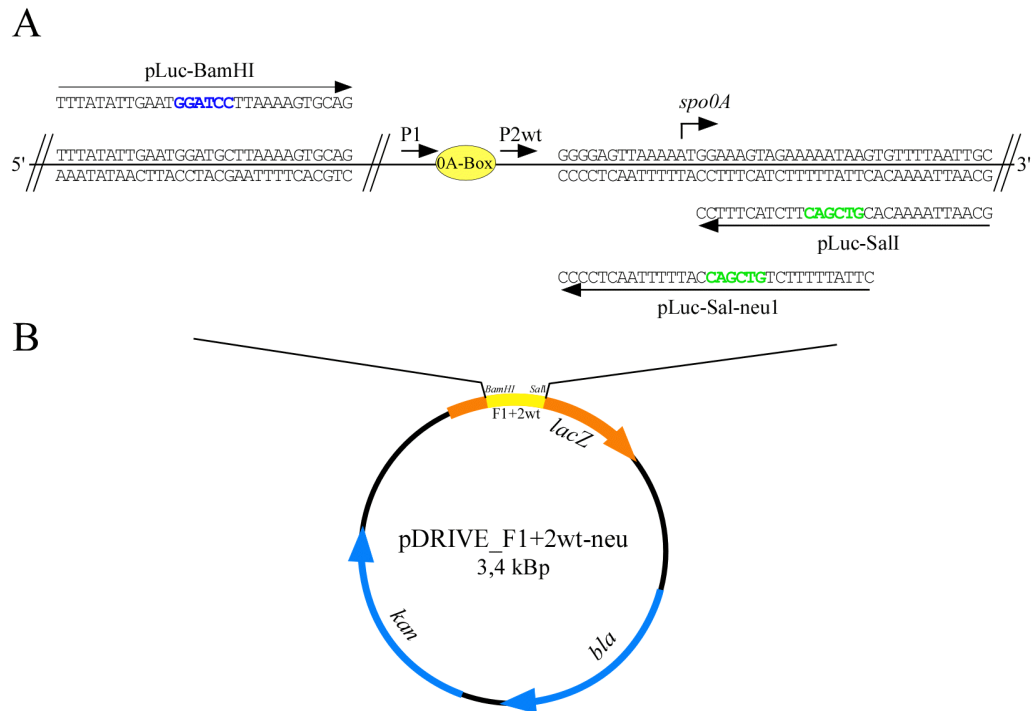
Nach Restriktionsverdau der Fragmente F1+2mut, F1+2wt und des Promotertestvektors pLucBF von Lothar Feustel (Stammsammlung AG Dürre Nr. 1648) mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I und anschließender Dephosphorylierung des Vektors wurde das mutierte und das Wildtyp-Promoterfragment vor das promoterlose *lucB*-Gen kloniert (Abb. 16 C). Die resultierenden Plasmide wurden pLucBF+F1+2mut und pLucBF+F1+2wt genannt.

Abbildung 16 (nächste Seite): Mutation von Palindrom 2 im Promoterbereich von *spo0A* und Klonierungsstrategie des mutierten Promoterfragments in den Vektor pLucBF. **A:** Schematisch dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Promoterregion von *spo0A*. Die putative OA-Box ist mit einem Kreis, die beiden Palindrome sind mit einem darüberliegenden Balken angezeigt. Die für die SOE-PCR verwendeten Mutagenese-„primer“ P2.2_F und P2.2_R sind mit Pfeilen gekennzeichnet, wobei die dadurch ausgetauschten Nukleotide farbig hervorgehoben sind. **B:** Durch die Verwendung von pLuc-BamHI und P2.2_R bzw. pLuc-SalI und P2.2_F wurden zunächst zwei einzelne Fragmente F1 und F2 generiert, die in einer weiteren PCR unter ausschließlicher Verwendung der äußeren „primer“ zu einem einzigen Fragment F1+2 fusioniert wurden. Mit pLuc-BamHI wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle und mit pLuc-SalI eine *Sal*I-Schnittstelle eingefügt. Als Kontrolle in weiteren Luciferase-Messungen diente ein Wildtyp-Promoterfragment, das nur mit dem äußeren „primer“-Paar amplifiziert worden war. Als Matrize wurde jeweils chromosomale DNA von *C. acetobutylicum* verwendet. **C:** Schematische Darstellung des Promotertestvektors pLucBF. Das in B hergestellte, im Bereich von P2 mutierte Promoterfragment sowie das Wildtyp-Promoterfragment von *spo0A* konnten über *Bam*HI und *Sal*I in den gleichermaßen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pLucBF vor das promoterlose *lucB*-Gen kloniert werden. *bla*: β -Lactamase-Gen; *ermC*: 23S rRNA Methylase.

verwendet und einfach in pLuc-SalI umbenannt. Wenn es sich bei dem Fehler in genannter Doktorarbeit nicht um einen Tippfehler handelt, bleibt es ungeklärt, wie mit auf diese Weise konstruierten Plasmiden bereits Luciferase-Aktivitäten bestimmt werden konnten. Außerdem wurden bei diesen Sequenzierungen Mutationen im *lucB*-Gen entdeckt. Diese waren im Anfangsbereich des Gens an den Positionen 35 und 48 lokalisiert, wobei die erste Mutation einen Basenaustausch von C zu T und die zweite einen Austausch von T zu G bedeutete. Der Austausch an Position 35 bewirkte eine Veränderung der Aminosäuresequenz von Alanin zu Valin, der Austausch an Position 48 stellte eine sog. stille Mutation dar.

Da beide Fragmente F1+2mut und F1+2wt in den Übergangsvektoren pCR[®]2.1-TOPO[®] bzw. pDRIVE[®] vorhanden waren, konnten die Fragmente unter Verwendung von pLuc-BamHI und eines neu konstruierten, weiter innen im Fragment liegenden Oligonukleotids pLuc-SalI-neu1 (Nr. 29 aus Tab. 3) neu amplifiziert werden. Die Verwendung dieses Oligonukleotids sollte einen „frameshift“ im *lucB*-Gen verhindern. Anschließend wurden die erhaltenen Fragmente erneut in den Vektor pDRIVE[®] kloniert (pDrive_F1+2wt-neu und pDrive_F1+2mut-neu). In Abb. 17 ist zur Verdeutlichung der Vorgehensweise das klonierte Wildtyp-Promoterfragment im Plasmid pDrive_F1+2wt-neu dargestellt. Mit den allgemein für die Sequenzierung von PCR-Fragmenten im pDRIVE[®]-Vektor verfügbaren Oligonukleotiden M13_fw und M13_rev konnten die Schnittstellen für *Bam*HI und *Sal*I sowie die Mutationen im F1+2mut bestätigt werden (s. 2.8.7).

Abbildung 17 (nächste Seite): F1+2wt-neu in pDRIVE[®]. **A:** Am Beispiel des Wildtyp-Promoterfragments ist die Amplifikation des Promoterbereiches unter Verwendung von pLuc-BamHI (*Bam*HI-Schnittstelle, blau markiert) und des neuen rückwärts-„primer“ pLuc-Sal-neu1 dargestellt. Im Vergleich zu pLuc-SalI bindet dieser im *lucB*-Gen 12 Basen weiter stromaufwärts und fügt ebenfalls eine *Sal*I-Schnittstelle (grün hervorgehoben) ein. Ein „frameshift“ bei der darauf folgenden Klonierung des Fragments in den neu konstruierten pLucBF_neu sollte dadurch verhindert werden. Die putative 0A-Box ist eingekreist, die Palindrome P1 und P2 sowie der Translationsstart von Spo0A sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **B:** Schematische Darstellung des Plasmids pDrive_F1+2wt-neu. Die Lage des inserierten Wildtyp-Promoterfragments im *lacZ*-Gen ist als gelber Balken gekennzeichnet. *bla*: β -Lactamase-Gen; *kan*: Kanamycin-Resistenzgen.



Für die Konstruktion eines neuen pLucBF-Vektors wurde zunächst das *lucB*-Gen mit den „primer“ pLucBF_fw und pLucBF_rev (Nr. 21 und 22 aus Tab. 3) mit dem Plasmid pBRLuc (von Damian Lynch, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Ulm, im Jahre 2002 zur Verfügung gestellt) als Matrize amplifiziert. Die „primer“ entsprachen den Oligonukleotiden pLucBF_down und pLucBF_up, die bereits Lothar Feustel für die Amplifikation des *lucB*-Gens verwendet hatte [Feustel et al., 2004]. Das Startkodon von *lucB* wurde dadurch durch eine *SalI*-Schnittstelle ersetzt und am 3'-Ende wurde eine *PstI*-Schnittstelle eingefügt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend in den Übergangsvektor pDRIVE® kloniert (pDrive_*lucB*) und mit den Oligonukleotiden pLucBF-seq-2fw (Nr. 31 aus Tab. 3), M13_fw und M13_rev sequenziert (s. 2.8.7). Nach einem Sequenzvergleich wurden im *lucB*-Gen insgesamt an 5 Stellen Mutationen identifiziert, die sich bei insgesamt 15 sequenzierten Proben wiederholten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Mutationen bereits im Ursprungsplasmid pBRLuc vorhanden gewesen sein müssen und keinen Einfluß auf die Bildung eines intakten LucB-Proteins haben, da bereits vor der vorliegenden Arbeit mit dem gleichen *lucB*-Gen erfolgreiche Luciferase-Messungen durchgeführt worden waren. Die Mutationen im *lucB*-Gen und deren Folgen für die Aminosäuresequenz sind in folgender Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Mutationen im *lucB*-Gen.

Position der Mutation im <i>lucB</i> -Gen	Basenaustausche	Änderung der AS-Sequenz
35	C → T	Alanin → Valin
48	T → G	stille Mutation
591	T → C	stille Mutation
1341	T → C	stille Mutation
1365	A → G	stille Mutation

Die Sequenzierung erfolgte mit den Oligonukleotiden pLucBF-seq-2fw (Nr. 31 aus Tab. 3), M13_fw und M13_rev. Angegeben sind die jeweiligen Basenaustausche und die dadurch verursachte Änderung der Aminosäure-Sequenz des *lucB*-Gens.

Nach einem Restriktinsverdau von pDrive_*lucB* mit den Enzymen *SalI* und *PstI* und einer anschließenden Aufreinigung des *lucB*-Gens erfolgte die Ligation in den gleichermaßen geschnittenen, dephosphorylierten und aufgereinigten Vektor pIMP1. Das erhaltene Plasmid wurde pLucBF_neu genannt.

Über die Schnittstellen *BamHI* und *SalI* wurden anschließend die Promoterfragmente F1+2wt-neu und F1+2mut-neu in das entsprechend geschnittene, dephosphorylierte und aufgereinigte Plasmid pLucBF_neu kloniert.

Um die so entstandenen Plasmide pLucBF_neu + F1+2wt-neu und pLucBF_neu + F1+2mut-neu in *C. acetobutylicum* transformieren zu können, mussten diese zum Schutz vor der in *C. acetobutylicum* existierenden Restriktionsendonuklease Cac824I zuerst spezifisch methyliert werden (s. 2.9.4.3). Daher wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* SURE™ Zellen, die das Plasmid pANS1 (mit der Information für die Methyltransferase Φ3T des Phagen Φ3TI; [Böhringer, 2002]) trugen, transformiert. Um bei nachfolgenden Luciferase-Messungen den durch das Plasmid pLucBF_neu gegebenenfalls allein verursachten Hintergrundwert von den ermittelten Werten der Lumineszenz abziehen zu können, wurde zusätzlich ein Plasmid pLucBF_neu ohne Promoterfragment vor dem Gen für die Luciferase methyliert.

Nachdem die Transformation nach mehreren Versuchen und unter Verwendung verschiedenster Medien und Protokollen letztendlich wie in 2.9.4 beschrieben erfolgreich war, wurde zur Kontrolle der Plasmide jeweils eine Kolonie von den Transformationsplatten abgenommen und in CGM mit Clarithromycin angeimpft (vgl. Tab. 4). Nach einer

Plasmidisolierung mit dem „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ (s. 2.4.6.4) wurde eine Standard-PCR (s. 2.8.1) mit der normalen *Taq*-Polymerase ohne „proof reading“-Aktivität durchgeführt. Dafür wurden die Oligonukleotide pLucBF-seq-1fw und pLucBF-seq-3-rev (Nr. 30 und 32 aus Tab. 3) verwendet. pLucBF-seq-1fw bindet 48 Nukleotide stromaufwärts von der *Bam*HI-Schnittstelle, über die die Promoterfragmente in den pLucBF_neu kloniert worden war, und pLucBF-seq-3rev bindet 62 Nukleotide stromabwärts der *Pst*I-Schnittstelle des *lucB*-Gens. Somit war für die Plasmide pLucBF_neu + F1+2wt-neu und pLucBF_neu + F1+2mut-neu jeweils eine Bande bei 2166 Bp zu erwarten, für pLucBF_neu würde eine Bande bei 1779 Bp das Vorhandensein des Plasmids in *C. acetobutylicum* bestätigen. In folgender Abbildung 18 ist das Ergebnis dieser PCR dargestellt.

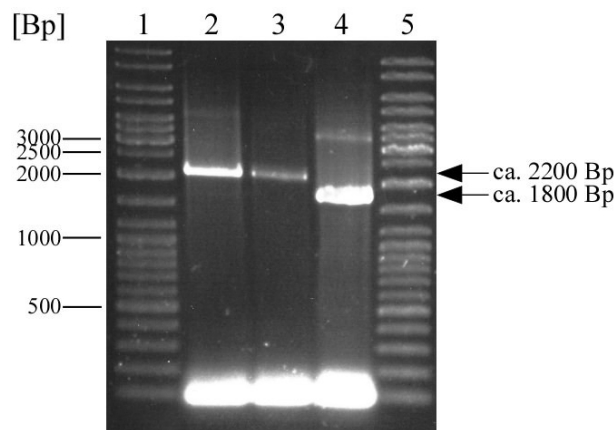


Abbildung 18: Nachweis der Plasmide pLucBF_neu + F1+2wt-neu, pLucBF_neu + F1+2mut-neu und pLucBF_neu in *C. acetobutylicum*. Nach der Elektrotransformation von *C. acetobutylicum* mit den genannten Plasmiden wurden diese mit Hilfe des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ aus *C. acetobutylicum* isoliert und als Matrize in eine Standard-PCR mit den Oligonukleotiden pLucBF-seq-1fw und pLucBF-seq-3rev eingesetzt. Die für pLucBF_neu + F1+2wt-neu und pLucBF_neu + F1+2mut-neu erwarteten Banden auf der Höhe von ca. 2200 Bp sind in den Spuren 2 bzw. 3 zu erkennen, die Bande in Spur 4 bei ca. 1800 Bp repräsentiert das *lucB*-Gen, vor das kein Promoterfragment kloniert wurde. Spuren 1, 5: Größenstandard „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“.

Da, wie Abbildung 18 zu entnehmen ist, alle drei Plasmide in *C. acetobutylicum* bestätigt werden konnten, wurden Sporensuspensionen der entsprechenden Kulturen hergestellt (s. 2.2.2.3).

Als Positivkontrolle des Messsystems wurde zusätzlich das Plasmid pLucBF_ptb (von Lothar Feustel, Feustel, 2004) verwendet. Dieses Konstrukt enthält den Promoterbereich des *ptb-buk*-Operons, das für die Phosphotransbutyrylase und Butyratkinase in *C. acetobutylicum* kodiert, als 500-Bp-*Bam*HI/*Sall*-Fragment vor dem *lucB*-Gen des pLucBF-Vektors. Vorangegangene Promoterstudien von Lothar Feustel mit Hilfe des Luciferase-Systems bestätigten die Aktivität dieses Promoters in der „Säurephase“ des Wachstums von *C. acetobutylicum* Feustel, 2004. Da das Konstrukt nicht in Form einer Sporensuspension von bereits transformierten *C. acetobutylicum*-Zellen existierte, musste es aus *E. coli* XL1-Blue-Zellen isoliert (Stammsammlung AG Dürre Nr. 1647), methyliert und erneut in *C. acetobutylicum* transformiert werden.

Es folgten Wachstumsversuche im 250-ml-Maßstab in phosphatlimitiertem Minimalmedium (MES-gepuffert). Zu verschiedenen Zeitpunkten im Wachstum wurden Proben entnommen und die spezifische Aktivität der Luciferase, wie in 2.12.11 beschrieben, bestimmt. Parallel wurden Proben für die Bestimmung der OD₆₀₀ und des pH-Wertes abgenommen. Das Wachstum verlief für alle vier rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme charakteristisch (vgl. Abb. 5) und es waren kaum Unterschiede in den untersuchten Parametern zu erkennen.

Mehrere Versuche zu Bestimmung der Luciferase-Aktivität blieben erfolglos. Da auch mit der eigentlichen Positivkontrolle pLucBF_ptb keine Luciferase-Aktivität gemessen werden konnte, dieses System aber bereits in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität eingesetzt worden war, waren Mutationen in den einzelnen Plasmiden die einzige Erklärung. Basenaustausche oder Rasterschübe in den klonierten Promoterfragmenten bzw. dem *lucB*-Gen würden die Expression des Luciferase-Gens verhindern. Da sowohl die Promoterfragmente F1+2wt-neu und F1+2mut-neu wie auch das *lucB*-Gen vor der Klonierung in den pLucBF_neu bzw. pIMP1 als richtig sequenziert worden waren, konnten nur die nachfolgenden Schritte, also die Klonierung in den pLucBF_neu, die Methylierung und Transformation der Plasmide in *C. acetobutylicum* für eventuelle Mutationen in Frage kommen. Die korrekte Basensequenz des aus *E. coli* XL1-Blue isolierten Plasmids pLucBF_ptb war vorausgesetzt worden.

Eine Sequenzierung (s. 2.8.7) aller Plasmide sollte aufzeigen, ob und wenn ja, in welchem Schritt der Klonierungsarbeiten Mutationen aufgetreten waren. So wurden die Plasmide pLucBF_neu + F1+2wt-neu und pLucBF_neu + F1+2mut-neu aus *E. coli* XL2-Blue und die Plasmide pLucBF_neu und pLucBF_ptb aus *E. coli* XL1-Blue sowie alle Plasmide in methylierter Form zum Sequenzieren geschickt. Außerdem wurden die Konstrukte aus *C. acetobutylicum* isoliert (s. 2.4.6.4). Nach „Retransformation“ in *E. coli* XL2-Blue

(s. 2.4.6.4) wurden die verschiedenen Promoterfragmente zuerst mit einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I nachgewiesen (s. 2.7.1), bevor auch diese Plasmide zur Sequenzierung weggeschickt wurden. Wie erwartet, konnten alle Konstrukte, die aus *C. acetobutylicum* isoliert worden waren, als korrekt bestätigt werden (Abb. 19). Banden der Größe von 434 Bp in den Spuren 2 und 3 stehen für das Wildtyp-*spo0A*- Fragment. In den Spuren 4 und 5 repräsentieren diese das mutierte *spo0A*-Promoterfragment. Das *ptb*-Promoterfragment mit einer Größe von 477 Bp wird in den Spuren 8 und 9 deutlich. In allen Proben konnte zudem der Vektor pLucBF_neu mit einer Größe von etwa 6300 Bp nachgewiesen werden. In den Spuren 6 und 7 zum Nachweis des pLucBF_neu, der kein Promoterfragment vor dem *lucB*-Gen trägt, war wie erwartet nur die Bande des Vektors zu erkennen.

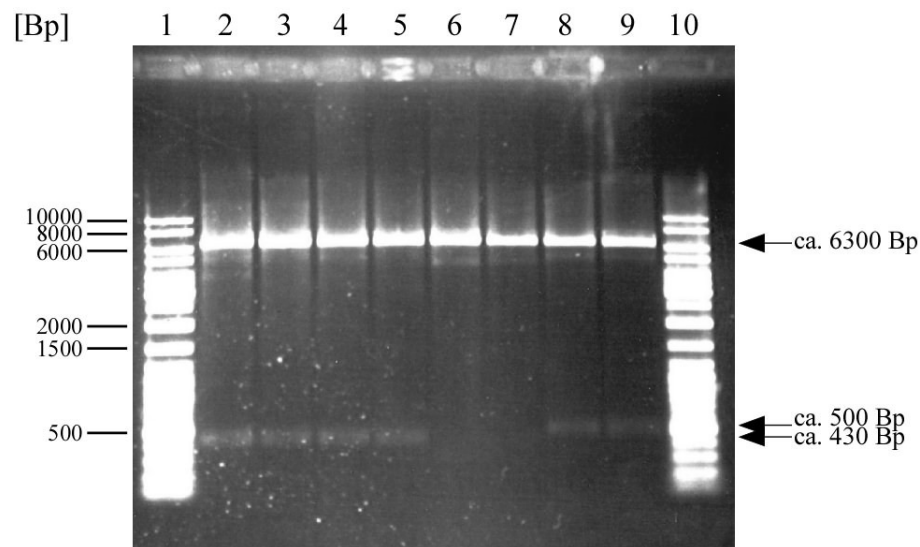


Abbildung 19: Nachweis der Plasmide pLucBF_neu + F1+2wt-neu, pLucBF_neu + F1+2mut-neu, pLucBF_neu und pLucBF_ptb in *C. acetobutylicum*. Mit Hilfe des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ wurden die Plasmide aus *C. acetobutylicum* isoliert und in *E. coli* XL2-Blue transformiert. Die daraus wiederum isolierten Plasmide wurden mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I geschnitten. Für pLucBF_neu + F1+2wt-neu (Spuren 2 und 3) und pLucBF_neu + F1+2mut-neu (Spuren 4 und 5) wurden Banden auf der Höhe von 434 Bp (Wildtyp-*spo0A*- bzw. mutiertes *spo0A*-Promoterfragment) und 6300 Bp (pLucBF_neu) erwartet. Der Restriktionsverdau von pLucBF_neu (Spuren 6 und 7) zeigte wie erwartet nur eine Bande bei 6300 Bp. Spuren 8 und 9 zeigen neben der 6300 Bp-Bande eine Bande bei ca. 500 Bp, die das *ptb*-Promoterfragment (477 Bp) repräsentiert. Spuren 1, 10: Größenstandard „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“.

Mit Hilfe der Oligonukleotide Sequ-Insert-fw, Sequ-lucB-fw, pLucBF-seq-2fw und pLucBF-seq-3rev (Nr. 31-34 aus Tab. 3) konnten alle Mutationen im *lucB*-Gen, wie sie in Tabelle 7 aufgeführt sind, erneut bestätigt werden (s. 2.8.7). In folgender Tabelle 8 sind zusätzlich aufgetretene Mutationen zusammengefasst.

Tabelle 8: Mutationen in den Plasmiden pLucBF_neu + F1+2wt-neu, pLucBF_neu + F1+2mut-neu, pLucBF_neu und pLucBF_ptb.

Plasmid	Basenaustausche (Position im Konstrukt)	Auswirkung bzw. Änderung der AS-Sequenz
pLucBF_neu + F1+2wt-neu	korrektes Wildtyp- <i>spo0A</i> - Promoterfragment in falscher Orientierung vor <i>lucB</i>	kein intaktes LucB-Protein
pLucBF_neu + F1+2mut-neu	korrekt mutiertes <i>spo0A</i> - Promoterfragment in falscher Orientierung vor <i>lucB</i>	kein intaktes LucB-Protein
pLucBF_neu	A → -- (73 Nukleotide vor der <i>Bam</i> HI-Schnittstelle im pIMP1- Rückrad)	dürfte keinen Einfluß haben; erwartungsgemäß kein intaktes LucB-Protein, da kein ATG
pLucBF_ptb	A → -- (73 Nukleotide vor der <i>Bam</i> HI-Schnittstelle im pIMP1- Rückrad) T → -- (2 Nukleotide vor <i>Sal</i> I am Ende der <i>ptb</i> - Promoterregion)	Rasterschub → kein intaktes LucB-Protein

Die Sequenzierung erfolgte mit den Oligonukleotiden Sequ-Insert-fw, Sequ-lucB-fw, pLucBF-seq-2fw und pLucBF-seq-3rev (Nr. 31-34 aus Tab. 3). Hier nicht dargestellt sind die aus Tab. 7 bekannten Mutationen im *lucB*-Gen, die bei diesen Sequenzierungen erneut nachgewiesen werden konnten. -- = Deletion.

Alle in Tab. 8 angeführten Mutationen bzw. Probleme waren bereits in den Plasmiden vorhanden, die vor der Methylierung aus den *E. coli* XL1-Blue- bzw. XL2-Blue-Zellen

isoliert worden waren. Im Fall von pLucBF_ptb war ein Rasterschub, verursacht durch eine Deletion, für ein nicht korrekt gebildetes LucB-Protein verantwortlich. Die Deletion 73 Nukleotide vor der *Bam*HI-Schnittstelle muss bereits von Anfang an im Vektor pIMP1 vorgelegen haben, in den das *lucB*-Gen kloniert worden war. Das Konstrukt pLucBF_ptb von Lothar Feustel lag dagegen bereits gebrauchsfertig vor. Die Messung von Luciferase-Aktivität, die in vorangegangenen Arbeiten mit diesem Plasmid erfolgreich durchgeführt worden waren, kann aber anhand dieser Mutation nicht nachvollzogen werden. Für die falsche Orientierung des Wildtyp-*spo0A*-Promoterfragments und des im P2 mutierten *spo0A*-Promoterfragments gibt es keine Erklärung, da beide Fragmente gerichtet, d. h. über zwei verschiedene Schnittstellen in den Vektor pLucBF_neu kloniert worden waren. Eine falsche Orientierung sollte unmöglich sein.

Im weiteren müssen demnach alle Konstrukte, deren Luciferase-Aktivität gemessen werden sollten, neu konstruiert werden, wobei bei jedem Amplifikations- und Klonierungsschritt eine Überprüfung durch Sequenzierung anzuraten ist.

3.4 Identifizierung der für die Phosphorylierung von Spo0A in *Clostridium acetobutylicum* verantwortlichen Kinase

In *Bacillus subtilis* wird die Endosporenbildung durch eine Signalübertragung mit Hilfe einer Serie von Phosphat-Überträgern induziert. Diese können als einzelne Domänen eines Zwei-Komponenten-Systems gesehen werden [Perego und Hoch, 2002]. Es ist bekannt, dass an der Phosphorylierung von Spo0A in *B. subtilis* insgesamt 5 Histidin-Kinasen (KinA-E) beteiligt sind (vgl. Abb. 1), die auf verschiedene intra- und extrazelluläre Signale reagieren. Dabei wird der Phosphatrest mit Hilfe des sog. „phosphorelay“ (vgl. Abb. 2) auf den „response regulator“ Spo0A übertragen. Die Phosphorylierung von Spo0A bewirkt dann die transkriptionsaktivierenden oder transkriptionsreprimierenden Eigenschaften des Proteins. Auf Grund von Genomsequenzierungen aus neuerer Zeit geht man allerdings davon aus, dass die „phosphorelay“-Komponenten Spo0F und Spo0B in Clostridien fehlen. Die Beantwortung der Frage nach der Art und Weise der Phosphorylierung von Spo0A in *C. acetobutylicum* war eines der Ziele der vorliegenden Arbeit.

Bei *B. subtilis* ist bekannt, dass die Kinase A, wenn auch mit niedriger Effizienz, Spo0A direkt phosphorylieren kann [Trach und Hoch, 1993]. Auch die Kinase C ist in der Lage, auf bestimmte Spo0A-Mutanten einen Phosphatrest direkt zu übertragen [Fabret et al., 1999]. Eine direkte Phosphorylierung von Spo0A in *C. acetobutylicum* scheint daher sehr wahrscheinlich.

Bei den Kinasen, die in *B. subtilis* für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortlich sind, handelt es sich um sog. „orphan“-Kinasen, d. h. in der näheren Nachbarschaft ist kein ORF zu finden, der für einen „response regulator“ kodieren würde. Spo0A wird als „orphan“-„response regulator“ bezeichnet, da kein Histidin-Kinase-Gen in der Nähe des *spo0A*-Gens lokalisiert ist. Da wie bereits erwähnt eine direkte Phosphorylierung von Spo0A durch eine oder mehrere „orphan“-Histidin-Kinasen wahrscheinlich ist, wurde in dem Genom von *C. acetobutylicum* nach Genen gesucht, die für „orphan“-Kinasen kodieren. 7 der insgesamt 37 Histidin- bzw. histidinähnlichen Kinasen, die in *C. acetobutylicum* gefunden wurden, wurden als „orphan“ identifiziert [Doß et al., 2005; Nölling et al., 2001]. Folgende Tabelle 9 fasst diese zusammen.

Tabelle 9: „orphan“-Histidin-Kinasen in *C. acetobutylicum*.

Gene der „orphan“-Histidin-Kinasen in <i>C. acetobutylicum</i>	Größe [Bp]	transmembrane Domänen
CAC0317 ^a	1497	+
CAC0323 ^a	1965	+
CAC0437	1914	-
CAC0863 ^a	903	-
CAC0903	2052	+
CAC2730 ^{a b}	912	+
CAC3319	1338	-

Angegeben sind die für die 7 „orphan“-Histidin-Kinasen kodierenden Gene und die jeweilige Größe in Bp. Außerdem ist mit + das Vorhandensein transmembraner Domänen angezeigt. -: keine transmembranen Domänen. ^a: Kinasen, die einen „response regulator“ in der Nachbarschaft ihres Gens, d. h. 2-4 Gene davon entfernt, haben. ^b: transmembrane Domäne überlappt mit Signalpeptid-Sequenz.

Nach einem Vergleich der zeitlichen Expressionsprofile der Gene, die für die fünf „phosphorelay“ Kinasen Kin A-E aus *B. subtilis* kodieren [Dartois et al., 1996; Jiang et al., 2000; LeDeaux und Grossman, 1995], mit denen der „orphan“-Kinase-Gene aus *C. acetobutylicum* (CAC0323, CAC0437, CAC0903, CAC2730 und CAC3319) [Alsaker und Papoutsakis, 2005], hatten Paredes et al. (2005) geschlussfolgert, dass die von CAC0323, CAC0437 und CAC0903 kodierten Kinasen aus *C. acetobutylicum* potentielle Kandidaten für

die Phosphorylierung von Spo0A seien [Paredes et al., 2005]. Auch das von CAC2730 kodierte Protein könnte ihrer Meinung nach aufgrund des Expressionsprofils seines Gens für eine Phosphorylierung des Transkriptionsregulators in Frage kommen [Paredes et al., 2005], obwohl, wie auch bei CAC0323, ein Gen für einen „response regulator“ in der weiteren Nachbarschaft zu finden ist. Aufgrund dessen wurden diese vier Kinase-Gene in der vorliegenden Arbeit ausgewählt, um die von Paredes et al. (2005) aufgestellte Hypothese zu überprüfen.

3.4.1 Heterologe Überexpression der von CAC0323, CAC0437, CAC0903 und CAC2730 kodierten Kinasen aus *C. acetobutylicum* in *E. coli*

Um in Phosphorylierungsversuchen mit dem Spo0A-Protein die Kinase identifizieren zu können, die tatsächlich für die Phosphorylierung des Transkriptionsregulators verantwortlich ist, sollten die von CAC0323, CAC0437, CAC0903 und CAC2730 kodierten Kinasen überexprimiert und aufgereinigt werden.

3.4.1.1 Verwendung des Überexpressionsvektors pQE-30

Die für die vier verschiedenen Kinasen kodierenden Gene aus *C. acetobutylicum* wurden zuerst in den Überexpressionsvektor pQE-30 (s. 2.12.1.1) kloniert und damit unter die Kontrolle eines T5-Promoters gestellt. Gleichzeitig wurden sie dadurch mit einer für 6 Histidine kodierenden Gensequenz („his-tag“) fusioniert (Abb. 20). Um den für die Phosphorylierungsaktivität der Kinasen notwendigen C-Terminus zu erhalten, erfolgte diese Fusion am N-Terminus der Gene. Dieser bei der heterologen Überexpression in *E. coli* M15 (pREP4) entstehende N-terminale 6x-Histidinrest sollte später der affinitätschromatographischen Reinigung an Ni-NTA Agarose (s. 2.12.3) dienen.

Mit den entsprechenden Oligonukleotiden, die in Tabelle 10 aufgeführt sind, wurden die Gene der Kinasen mit Gesamt-DNA von *C. acetobutylicum* (s. 2.4.1) als Matrize in einer Standard-PCR mit der „PowerScript Short DNA Polymerase“ bzw. der „High Fidelity Polymerase“ amplifiziert (s. 2.8.1). Für die spätere Klonierung in den für die Überexpression gewählten Vektor pQE-30 wurde dabei mit dem vorwärts-„primer“ eine *Bam*HI-Schnittstelle und mit dem rückwärts-„primer“ eine *Pst*I-Schnittstelle eingefügt. Außerdem wurden die Gene ohne Start- und Stoppkodon amplifiziert. Da die Kinasen, kodiert von CAC0323 und CAC0903, am N-Terminus größere transmembrane Domänen aufweisen (vgl. Tab. 9), wurden die dafür kodierenden Gene zusätzlich in einer N-terminal verkürzten Variante hergestellt. Dabei

wurden mit den entsprechenden „primer“ (in Tab. 10 mit „-trunc“ gekennzeichnet) von CAC0323 701 Bp und von CAC0903 656 Bp am N-Terminus abgeschnitten.

Tabelle 10: PCR-„primer“ für die Amplifikation der Gene CAC0323, CAC0323_trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903_trunc und CAC2730 aus *C. acetobutylicum* für die anschließende Klonierung in pQE-30 und die Größe der dadurch entstandenen PCR-Produkte.

„orphan“-Histidin-Kinase-Gen (Kurzbezeichnung)	vorwärts-„primer“ (Nr. aus Tab. 3)	rückwärts-„primer“ (Nr. aus Tab. 3)	PCR-Produkt [Bp]
CAC0323 (Kin1)	P0323-Bam_fw (35)	P0323-Pst_rev (37)	1992
CAC0323_trunc (Kin2)	P0323-trunc-Bam_fw (36)	P0323-Pst_rev (37)	1285
CAC0437 (Kin3)	P0437-Bam_fw (38)	P0437-Pst_rev (39)	1945
CAC0903 (Kin4)	P0903-Bam_fw (40)	P0903-Pst_rev (42)	2084
CAC0903_trunc (Kin5)	P0903-trunc-Bam_fw (41)	P0903-Pst_rev (42)	1425
CAC2730 (Kin6)	P2730-Bam_fw (43)	P2730-Pst_rev (44)	938

_trunc= N-terminal verkürzte Varianten der Gene CAC0323 und CAC0903. Kin1-Kin6: Kurzbezeichnung der von CAC0323, CAC0323_trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903_trunc und CAC2730 kodierten Kinasen (wird im Weiteren der Übersicht halber verwendet, wenn von den durch oben genannte Gene kodierten Proteinen die Rede ist).

Nach dem Restriktionsverdau des Vektors pQE-30 und der PCR-Produkte mit *Bam*HI und *Pst*II (s. 2.7.1) und der Dephosphorylierung des Vektors (s. 2.7.2) erfolgte die Ligation (s. 2.7.3) und die Transformation in *E. coli* XL2-Blue (s. 2.9.1). Die erhaltenen Plasmide wurden pQE30_CAC0323, pQE30_CAC0323-trunc, pQE30_CAC0437, pQE30_CAC0903, pQE30_CAC0903-trunc und pQE30_CAC2730 genannt. In folgender Abbildung 20 ist beispielhaft das Plasmid pQE30_CAC0323 dargestellt.

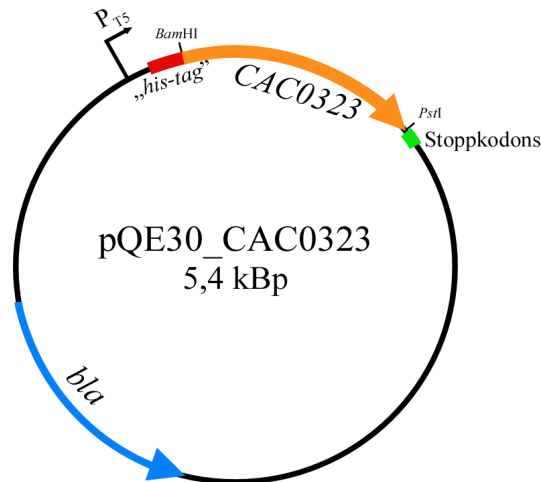


Abbildung 20: Plasmid pQE30_CAC0323. Über die Schnittstellen *Bam*HI und *Pst*I wurde das Gen CAC0323 aus *C. acetobutylicum* (orange-farbener Pfeil) ohne Start- und Stoppkodon in den gleichermaßen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pQE-30 kloniert und so unter die Kontrolle des T5-Promoters (P_{T5} , als Pfeil dargestellt) gestellt. Rot markiert ist die N-terminal fusionierte, für 6 Histidine kodierende Gensequenz („his-tag“). In grün sind die im pQE-30 Vektor enthaltenen Stoppkodons für alle drei möglichen Leserahmen dargestellt. *bla*: β -Lactamase-Gen.

Mit den Oligonukleotiden pQE30_T5_F, pQE30_stop_R (Nr. 51 und 52 aus Tab. 3) bzw. 0323-Mitte_fw, 0323-Mitte_rev, 0437-Mitte_fw, 0437-Mitte_rev, 0903-Mitte_fw und 0903-Mitte_rev (Nr. 45-50 aus Tab. 3) wurden die Plasmide auf Mutationen überprüft (s. 2.8.7). Fehlerfrei sequenzierte Plasmide wurden mittels Elektrottransformation in den Überexpressionsstamm *E. coli* M15 (pREP4) transformiert (s. 2.9.2). In folgender Tabelle 11 sind die mit Hilfe von Sequenzdaten und eines im Internet verfügbaren Programms (Sequence manipulation Suite: http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) errechneten Proteinmassen der Kinasen Kin1-6 inklusive des 6xHis-Rests dargestellt.

Tabelle 11: Errechnete Proteinmassen der Kinasen Kin1-6 aus *C. acetobutylicum*, die in *E. coli* M15 (pREP4) mit Hilfe des Überexpressionsvektors pQE-30 überproduziert werden sollten.

Kinase (dafür kodierendes Gen)	Proteinmasse [kDa]
Kin1 (CAC0323)	77,79
Kin2 (CAC0323_trunc)	50,05
Kin3 (CAC0437)	76,08
Kin4 (CAC0903)	80,36
Kin5 (CAC0903_trunc)	55,12
Kin6 (CAC2730)	37,34

Dargestellt sind die mit Hilfe eines im Internet frei verfügbaren Programms (Sequence manipulation Suite: http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) errechneten Proteinmassen inklusive des 6xHis-Rests in kDa. _trunc: N-terminal verkürzte Varianten der Gene CAC0323 und CAC0903.

Die Überproduktion der Proteine erfolgte analog zu 2.12.1.3 in 500 ml TB-Medium. Bei dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8-1 wurde die Expression der Proteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 2-4 h wurde die optische Dichte erneut kontrolliert. Dabei zeigte sich im Vergleich zu nicht induzierten Kontrollkulturen der gleichen Stämme, dass die Kulturen, welche die von CAC0323, CAC0903 und CAC2730 kodierten Proteine (Kin1, Kin4, Kin6) überproduzieren sollten, nach Induktion nahezu kein Wachstum mehr aufwiesen. Die optischen Dichten der Kulturen, welche die N-terminal verkürzte Variante des von CAC0323 kodierten Proteins (Kin2) und die von CAC0437 kodierte Kinase (Kin3) überproduzieren sollten, konnten sich in den 2-4 h nur knapp verdoppeln. Nahezu normales Wachstum im Vergleich zu einer nicht induzierten Kontrollkultur zeigte die Kultur, welche die N-terminal verkürzte Variante des von CAC0903 kodierten Proteins (Kin5) bilden sollte. Demnach schien die Induktion der Expression fast aller Kinasen das Wachstum des Überexpressionsstammes mehr oder weniger negativ zu beeinflussen.

Nach Aufreinigung der Rohextrakte (s. 2.12.2) über eine Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure (s. 2.12.3) konnten die Proteine in einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.12.6) mit anschließender Silber-Färbung (s. 2.12.8) oder einem „Western blot“ (s. 2.12.9, 2.12.10) zum immunologischen Nachweis des Histidinrests nicht detektiert werden. Daran änderte sich auch nichts, wenn die Expression der Kinase-Gene bei einer höheren optischen Dichte der Kulturen (2-2,5) induziert wurde. Auch

im Zellsediment, das nach der Herstellung der Proteinrohextrakte übrig blieb, war der Nachweis der Proteine nicht möglich. Ein Zweifel an der Aktivität des IPTG konnte nach erfolgreicher Überexpression von Spo0A (s. 3.4.5) ausgeräumt werden. Ein nächster Verdacht war, dass eventuell die *E. coli* M15 (pREP4)-Stämme mit den entsprechenden Plasmiden nicht aus Glycerinkulturen (s. 2.2.2.3) angeimpft werden durften. In *E. coli*-Kulturen, die höchstens einen Tag vorher mit den verschiedenen Plasmiden transformiert worden waren, konnten die Proteine aber ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Neubestellung des Expressionsstammes von der Firma Qiagen GmbH hatte ebenso keinen Einfluss auf die Expression und den Nachweis der Proteine wie die Zugabe von zusätzlicher Glucose zum Medium, um die geringe Basalexpression der Gene vor Induktion noch mehr zu verringern. Da auch die zur Überexpression der Proteine konstruierten pQE-30-Plasmide aus *E. coli* M15 (pREP4) am T5-Promoter beginnend bis hin zu den Stoppkodons erneut als fehlerfrei sequenziert worden waren (Oligonukleotide Nr. 45-52 aus Tab. 3, s. 2.8.7), sollte in folgenden Experimenten der Vektor pQE-80L für die Überexpression der Kinasen Verwendung finden.

3.4.1.2 Verwendung des Überexpressionsvektors pQE-80L

Der Vektor pQE-80L (s. 2.12.1.1) beinhaltet im Vergleich zum pQE-30 ein zusätzliches *lacI^q*-Gen, d. h. eine mutierte Form des *lacI*-Gens, wodurch eine sehr große Menge an Lac-Repressor-Protein gebildet wird. Dadurch wird eine noch effizientere Unterdrückung der Proteinexpression vor der Induktion erreicht und Herstellerangaben zu Folge ist dieser Vektor vor allem für die Überexpression von sehr toxischen Proteinen geeignet. Der pQE-80L-Vektor unterscheidet sich aber ansonsten nicht von dem pQE-30-Expressionssystem. Da bei den Kulturen, die die verschiedenen Kinasen überproduzieren sollten, nach Induktion z. T. ein deutlicher Wachstumsnachteil entstanden war (s. 3.4.1.1), diese Proteine demnach in gewissem Maße für den Organismus toxisch zu sein schienen, war die Verwendung dieses Vektors erfolgversprechend.

Die für die insgesamt sechs verschiedenen Kinasen kodierenden Gene konnten über die gleichen Schnittstellen (*Bam*HI und *Pst*I) in den Überexpressionsvektor pQE-80L kloniert werden. Hierfür wurden die Plasmide pQE30_CAC0323, pQE30_CAC0323-trunc, pQE30_CAC0437, pQE30_CAC0903, pQE30_CAC0903-trunc und pQE30_CAC2730 sowie der Vektor pQE-80L mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Pst*I geschnitten (s. 2.7.1). Nach Dephosphorylierung (s. 2.7.2) und Aufreinigung des Vektors (s. 2.5.7) erfolgte die Ligation (s. 2.7.3) und die Transformation in *E. coli* XL2-Blue (s. 2.9.2). Die erhaltenen Plasmide wurden pQE80L_CAC0323, pQE80L_CAC0323-trunc, pQE80L_CAC0437, pQE80L_CAC0903, pQE80L_CAC0903-trunc und pQE80L_CAC2730 genannt. In folgender

Abbildung 21 ist beispielhaft das Plasmid pQE80L_CAC0323 dargestellt. Somit wurden die Gene wie schon im Vektor pQE-30 unter die Kontrolle eines T5-Promoters gestellt. Die Fusion mit einer für 6 Histidine kodierenden Sequenz am N-Terminus sollte später der affinitätschromatographischen Reinigung an Ni-NTA Agarose (s. 2.12.3) dienen.

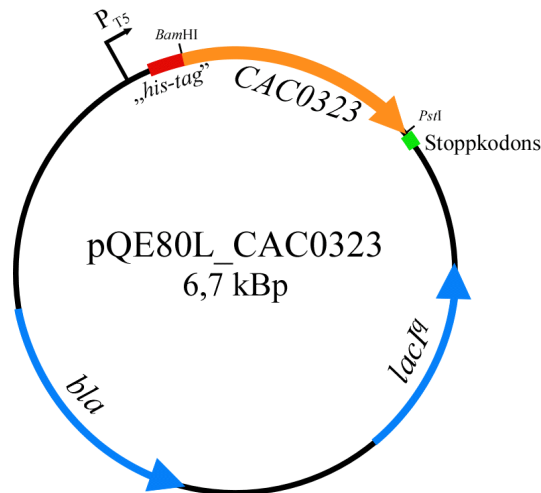


Abbildung 21: Plasmid pQE80L_CAC0323. Über die Schnittstellen *Bam*HI und *Pst*I wurde das Gen CAC0323 aus *C. acetobutylicum* (orange-farbener Pfeil) ohne Start- und Stoppkodon aus dem Vektor pQE-30 in den gleichermaßen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pQE-80L kloniert und so unter die Kontrolle des T5-Promoters (P_{T5} , als Pfeil dargestellt) gestellt. Rot markiert ist die N-terminal fusionierte, für 6 Histidine kodierende Gensequenz („his-tag“). In grün sind die im pQE-80L Vektor enthaltenen Stoppkodons für alle drei möglichen Leserahmen dargestellt. *bla*: β -Lactamase-Gen. *lacI^q*: mutiertes *lacI*-Gen.

Nach Transformation der Plasmide in den Überexpressionsstamm *E. coli* M15 (pREP4) wurden die Oligonukleotide pQE30_T5_F, pQE30_stop_R, pQE_Insert_fw (Nr. 51-53 aus Tab. 3) bzw. 0323-Mitte_fw, 0323-Mitte_rev, 0437-Mitte_fw, 0437-Mitte_rev, 0903-Mitte_fw und 0903-Mitte_rev (Nr. 45-50 aus Tab. 3) für die Sequenzierung der Plasmide verwendet (s. 2.8.7). Die errechneten Proteinmassen der von CAC0323, CAC0323_trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903_trunc und CAC2730 kodierten Kinasen (Kin1-6), die in *E. coli* M15 (pREP4) mit Hilfe des Überexpressionsvektors pQE-30 überproduziert werden sollten, gelten auch für die Proteine, die mit dem Vektor pQE-80L überproduziert werden sollten und sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Zum Test sollten vorerst nur Kin1, Kin2 und Kin3 überproduziert werden. Die Überexpression erfolgte wie schon in 3.4.1.1 analog zu 2.12.1.3 in 500 ml TB-Medium. Allerdings wurde die Expression der Gene in allen drei Kulturen erst bei Erreichen einer optischen Dichte von ca. 3 induziert. 4 h nach Induktion wurden die Zellen, wie in 2.12.1.3 beschrieben, geerntet. Als Positivkontrolle wurde das Protein HprK/P analog zu 2.12.1.3 und 3.4.6.2 überproduziert. Nach Herstellung der Rohextrakte (s. 2.12.2) wurde ein Teil jedes Zellsediments nach Ultrazentrifugation für eine spätere Kontrolle im SDS-Gel aufbewahrt. Ebenso wurde für die spätere Kontrolle bei der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose ein Teil jeden Durchflusses aufgefangen, der nach dem Auftragen des Rohextrakts auf die Säule durch das Ablassen entsteht und normalerweise verworfen wird (s. 2.12.3). Diese Proben wurden zusammen mit den mit 250 mM Imidazol erhaltenen Eluaten der jeweiligen Proteine nach einer Affinitätschromatografie an Nickel-Nitrilotriessigsäure (s. 2.12.3) einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wie in 2.12.6 beschrieben, unterzogen. Ein anschließendes „Western blot“-Experiment mit spezifischen Antikörpern gegen 6xHis-Reste (s. 2.12.9, 2.12.10) sollte Aufschluss über die Überproduktion der gewünschten Proteine liefern. In folgender Abbildung 22 ist das Ergebnis dieses Experiments dargestellt.

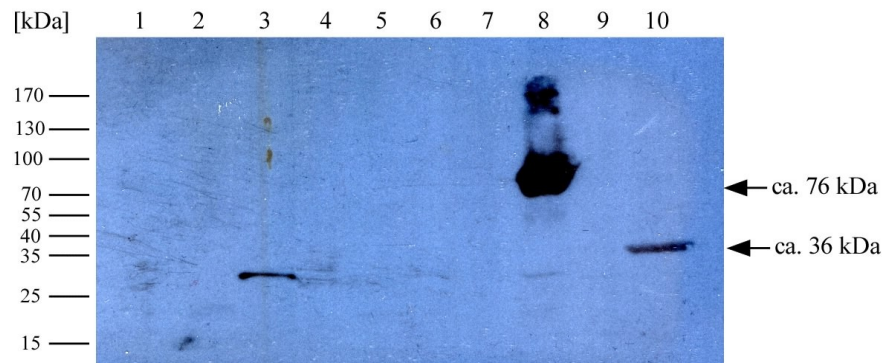


Abbildung 22: „Western blot“-Experiment mit spezifischen Antikörpern gegen 6xHis-Reste und Proben aus einer heterologen Überexpression der von CAC0323, CAC0323-trunc und CAC0437 kodierten Proteine Kin1, Kin2 und Kin3 in *E. coli* M15 (pREP4) mittels des Überexpressionsvektors pQE-80L. Der auf dem Gel aufgetragene Protein-Größenmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“) ist neben Spur 1 schematisch dargestellt. Spur 1: Durchfluss Kin1. Spur 2: Zellsediment Kin1. Spur 3: Kin1-Eluat mit 250 mM Imidazol. Spur 4: Durchfluss Kin2. Spur 5: Zellsediment Kin2. Spur 6: Kin2-Eluat mit 250 mM Imidazol. Spur 7: Durchfluss Kin3. Spur 8: Zellsediment Kin3. Spur 9: Kin3-Eluat mit 250 mM Imidazol. Spur 10: HprK/P-Eluat mit 250 mM Imidazol. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind das HprK/P-Protein (ca. 36 kDa) in Spur 10 und Kin3 (ca. 76 kDa) in Spur 8.

Wie in Spur 10 zu erkennen ist, ließ sich das Protein HprK/P immunologisch mit spezifischen Antikörpern gegen seinen 6xHis-Rest nachweisen. Bei der Bande in Spur 3 handelt es sich um ein fremdes Protein (Spo0A, ca. 33 kDa, persönliche Mitteilung von S. Brehm), das am Tag zuvor unglücklicherweise mit der gleichen Säule aufgereinigt worden war. In Spur 8, in der ein Teil des Zellsediments der *E. coli* M15 (pREP4)-Kultur aufgetragen wurde, die das Plasmid pQE80L_CAC0437 trägt, ist ebenfalls ein Signal zu erkennen. Die mit Hilfe von Sequenzdaten und eines im Internet verfügbaren Programms errechneten Proteinmassen von HprK/P und Kin3 (inkl. des fusionierten 6x-Histidinrests) mit ca. 36 (vgl. Tab. 18) bzw. ca. 76 kDa (vgl. Tab. 11) konnten bei einem Vergleich mit einem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Größenstandard „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ bestätigt werden. Da allerdings Kin3 nur im Zellsediment und die beiden anderen Kinasen Kin1 und Kin2 in keiner der aufgetragenen Proben nachzuweisen waren, somit also die Verwendung des Vektors pQE-80L keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression zu haben schien, sollte alternativ dazu im Weiteren der Vektor pET-28(a)+ eingesetzt werden.

3.4.1.3 Verwendung des Überexpressionsvektors pET-28(a)+

Das pET-Expressionssystem (s. 2.12.1.2), zu dem auch der Vektor pET-28(a)+ zählt, hat den Vorteil, dass es durch Zusammenwirken von Expressionsstamm und -plasmid zu einer sehr geringen Hintergrundexpression und damit Proteinproduktion vor der Induktion kommt. Wie schon der pQE-80L trägt der pET-28(a)+ ein auf dem Plasmid kodiertes *lacI*-Gen, dessen konstitutive Expression in Abwesenheit von IPTG den induzierbaren *T7lac* Promoter [Dubendorff und Studier, 1991; Studier et al., 1990] effizient reprimiert. Zusätzlich zu der Kopie auf dem Plasmid befindet sich im Chromosom des Überexpressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3) ebenfalls das Gen für den Lac-Repressor, *lacI*. In Abwesenheit von IPTG reprimiert der Lac-Repressor zudem den *lacUV5*-Promoter, der normalerweise die Expression der T7 RNA-Polymerase (liegt auf dem Chromosom des *E. coli*-Expressionsstammes und kontrolliert wiederum den *T7lac*-Promoter) regelt. Durch entsprechende Klonierung des gewünschten Gens in den Vektor lässt sich entweder ein N- oder ein C-terminaler 6x-Histidinrest anhängen.

Für die Klonierung der Kinase-Gene in den pET-28(a)+ konnte nicht wie bei pQE-30 und pQE-80L die Restriktionsschnittstelle *Pst*I am 3'-Ende des Gens verwendet werden. Die insgesamt sechs verschiedenen Kinase-Gene mussten mit neuen, in Tabelle 12 aufgeführten Oligonukleotiden und Gesamt-DNA von *C. acetobutylicum* (s. 2.4.1) als Matrize in einer Standard-PCR mit der „PowerScript Short DNA Polymerase“ neu amplifiziert werden (s. 2.8.1). Für die spätere Klonierung in den für die Überexpression gewählten Vektor

pET-28(a)+ wurde dabei mit dem rückwärts-„primer“ jeweils eine *SaI*I-Schnittstelle eingefügt. Die vorwärts-„primer“ waren identisch zu den bereits in Tab. 10 aufgeführten Oligonukleotiden und fügten eine *Bam*HI-Schnittstelle ein. Zu beachten war außerdem, dass diesmal das Stoppkodon der einzelnen Gene mitamplifiziert werden musste, um ein Anhängen der 6 Histidine am N-Terminus zu erreichen. Dieser 6xHis-Rest sollte später der affinitätschromatographischen Reinigung an Ni-NTA Agarose (s. 2.12.3) dienen.

Tabelle 12: Rückwärts-„primer“ für die Amplifikation der Kinase-Gene CAC0323, CAC0323_trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903_trunc und CAC2730 aus *C. acetobutylicum* für die Klonierung in pET-28(a)+.

Kinase (dafür kodierendes Gen)	rückwärts-„primer“ (Nr. aus Tab. 3)	PCR-Produkt [Bp]
Kin1 (CAC0323)	P0323_revSalI (54)	1991
Kin2 (CAC032_trunc)	P0323_revSalI (54)	1286
Kin3 (CAC0437)	P0437_revSalI (55)	1946
Kin4 (CAC0903)	P0903_revSalI (56)	2084
Kin5 (CAC0903_trunc)	P0903_revSalI (56)	1426
Kin6 (CAC2730)	P2730_revSalI (57)	939

_trunc: N-terminal verkürzte Varianten der Gene CAC0323 und CAC0903. Die verwendeten vorwärts-„primer“ sind identisch zu den in Tab. 10 aufgeführten Oligonukleotiden.

Nach dem Restriktionsverdau des Vektors pET-28(a)+ und der PCR-Produkte mit *Bam*HI und *SaI*I (s. 2.7.1) und der Dephosphorylierung des Vektors (s. 2.7.2) erfolgte die Ligation (s. 2.7.3) und die Transformation in *E. coli* XL2-Blue (s. 2.9.1). Die Gene wurden somit unter die Kontrolle des mit IPTG induzierbaren T7-Promoters gestellt. Die erhaltenen Plasmide wurden pET28a_CAC0323, pET28a_CAC0323-trunc, pET28a_CAC0437, pET28a_CAC0903, pET28a_CAC0903-trunc und pET28a_CAC2730 genannt. In folgender Abbildung 23 ist beispielhaft das Plasmid pET28a_CAC0323 dargestellt.

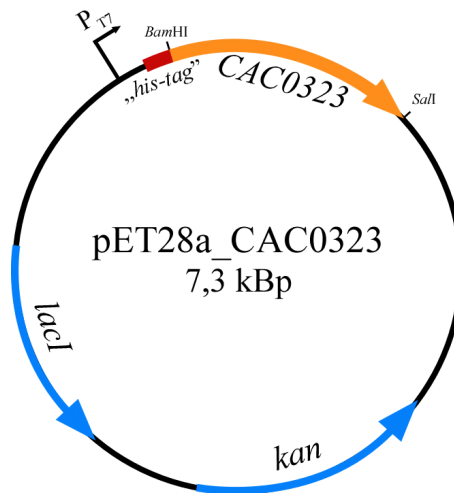


Abbildung 23: Plasmid pET28a_CAC0323. Über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I wurde das Gen CAC0323 aus *C. acetobutylicum* (orange-farbener Pfeil) ohne Start- aber mit Stoppkodon in den gleichermaßen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pET-28(a)+ kloniert und so unter die Kontrolle des T7-Promoters (P_{T7} , als Pfeil dargestellt) gestellt. Rot markiert ist die N-terminal fusionierte, für 6 Histidine kodierende Gensequenz („his-tag“). *kan*: Kanamycin-Resistenzgen. *lacI*: Gen für Lac-Repressor.

Mittels Elektrotransformation wurden die Plasmide in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) gebracht. In folgender Tabelle 13 sind die mit Hilfe von Sequenzdaten und eines im Internet verfügbaren Programms (Sequence manipulation Suite: http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) errechneten Proteinmassen der Kinasen Kin1-6 inklusive des 6xHis-Rests nach Überexpression mit Hilfe des pET-28(a)+-Vektors dargestellt.

Tabelle 13: Errechnete Proteinmassen der Kinasen Kin1-6 aus *C. acetobutylicum*, die in *E. coli* BL21 (DE3) mit Hilfe des Überexpressionsvektors pET-28(a)+ überproduziert werden sollten.

Kinase (dafür kodierendes Gen)	Proteinmasse [kDa]
Kin1 (CAC0323)	79,39
Kin2 (CAC0323_trunc)	51,65
Kin3 (CAC0437)	77,84
Kin4 (CAC0903)	82,12
Kin5 (CAC0903_trunc)	56,88
Kin6 (CAC2730)	39,09

Dargestellt sind die mit Hilfe eines im Internet frei verfügbaren Programms (Sequence manipulation Suite: http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) errechneten Proteinmassen inklusive des 6xHis-Rests in kDa. _trunc= N-terminal verkürzte Varianten der Gene CAC0323 und CAC0903.

Die Überproduktion der Proteine erfolgte analog zu 2.12.1.3 in 500 ml TB-Medium, wobei erst bei einer optischen Dichte der Kulturen von etwa 2,5-3 die Expression der Gene mit 1 mM IPTG induziert wurde. Keine der Kinasen konnte im Zellsediment nach Zellernte in einem anschließenden „Western blot“-Experiment (s. 2.12.9, 2.12.10) nachgewiesen werden.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Kodon-Nutzung in *E. coli* und *C. acetobutylicum* ATCC 824 so verschieden ist, dass aufgrund dessen Schwierigkeiten in der Expression der clostridialen Gene in *E. coli* auftreten, wurde dies mittels eines Programms im Internet überprüft (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Tatsächlich konnten, wie Tabelle 14 zeigt, deutliche Unterschiede in dem Gebrauch verschiedener Kodons zur Proteinsynthese festgestellt werden. Da der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) laut Hersteller des pET-Expressionssystems (Novagen R&D Systems) ein Derivat von *E. coli* Stamm B834 und dieser wiederum ein Abkömmling von *E. coli* Stamm B ist (vgl. dazu „*pET System Manual*, 11th Edition“), wurde zum Vergleich der „codon usage“ zwischen *E. coli* und *C. acetobutylicum* der *E. coli* Stamm B herangezogen. Wie Tabelle 14 zu entnehmen ist, werden besonders die drei Kodons AUA, AGA und GGA in *C. acetobutylicum* bis zu 11 mal öfter zur Proteinbildung verwendet, als dies in *E. coli* Stamm B der Fall ist.

Tabelle 14: Häufigkeit der zur Proteinsynthese verwendeten Kodons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA und CGG in *E. coli* Stamm B und *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Kodon-Triplett	Häufigkeit pro 1000 Kodons	
	<i>E. coli</i> Stamm B	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
AUA	5,0	55,6
AGG	2,1	5,9
AGA	2,4	23,5
CUA	3,4	9,5
CCC	2,4	1,3
GGA	8,2	32,1
CGG	5,0	0,2

Aus diesem Grund wurden die Plasmide pET28a_CAC0323, pET28a_CAC0323-trunc, pET28a_CAC0437, pET28a_CAC0903, pET28a_CAC0903-trunc und pET28a_CAC2730 mittels Elektrottransformation (s. 2.9.2) in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) transformiert. Diese Wirts-Zellen enthalten zusätzlich das Plasmid pRARE, das tRNA Gene trägt, die für alle in *E. coli* allgemein selten genutzten Aminosäurekodons kodieren (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, CGG). Durch deren Expression sollte eine Beeinträchtigung der heterologen Expression durch Häufungen solcher Kodons im zu exprimierenden Gen vermieden werden [Brinkmann et al., 1989; Del Tito et al., 1995; Rosenberg et al., 1993; Seidel et al., 1992].

Die Überproduktion der Proteine erfolgte analog zu 2.12.1.3 in 500 ml TB-Medium, wobei wieder erst bei einer optischen Dichte der Kulturen von etwa 2,5-3 die Expression der Gene mit 1 mM IPTG induziert wurde. Zwei Wachstumsversuche, bei denen die Expression der Gene zu einem späten Zeitpunkt induziert, die Kulturen aber einmal schon nach einer halben Stunde und beim zweiten mal erst nach 4 h nach Induktion geerntet worden waren, sind in der Abbildung 24 in Form der dazugehörigen „Western blot“-Experimente dargestellt. Als Positivkontrolle wurde jeweils das Protein CcpA überproduziert (s. 3.4.6.2) und ein Teil des Zellsediments nach Ernte der Zellen mit auf das Gel aufgetragen. Von allen anderen Proben wurde ebenfalls nach dem Ernten der Zellen ein Teil des Zellsediments mit 1 x Protein-Ladepuffer versetzt und auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen (s. 2.12.6), bevor analog zu 2.12.9 und 2.12.10 die „Western blot“-Experimente erfolgten.

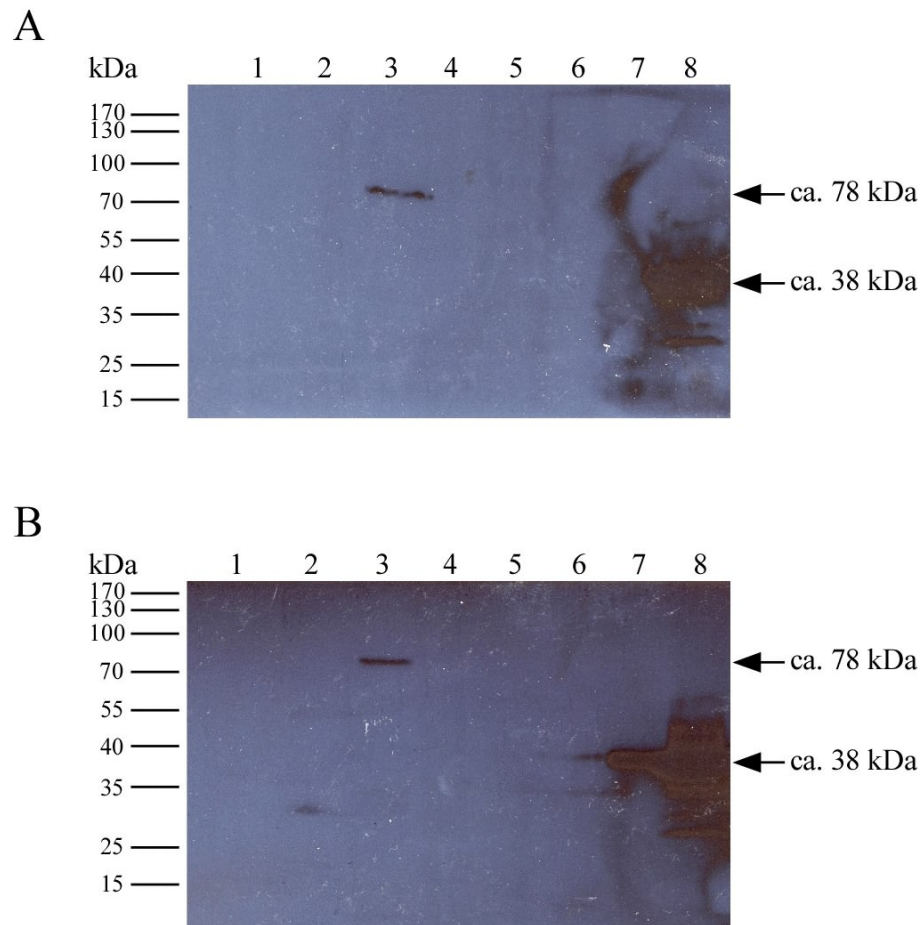


Abbildung 24: „Western blot“-Experimente mit spezifischen Antikörpern gegen 6xHis-Reste und Proben aus einer heterologen Überexpression der von CAC0323, CAC0323-trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903-trunc und CAC2730 kodierte Proteine Kin1-6 in *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) mittels des Überexpressionsplasmids pET-28(a)+. **A:** Auf das Gel sind Zellsedimentproben aus der Ernte der Zellen 30 min nach Induktion der Genexpression aufgetragen. Der auf dem Gel aufgetragene Protein-Größenmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“) ist neben Spur 1 schematisch dargestellt. Spur 1: Zellsediment Kin1. Spur 2: Zellsediment Kin2. Spur 3: Zellsediment Kin3. Spur 4: Zellsediment Kin4. Spur 5: Zellsediment Kin5. Spur 6: Zellsediment Kin6. Spur 7: frei. Spur 8: Positivkontrolle Zellsediment CcpA. **B:** Auf das Gel sind Zellsedimentproben aus der Ernte der Zellen 4 h nach Induktion der Genexpression aufgetragen. Der auf dem Gel aufgetragene Protein-Größenmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“) ist neben Spur 1 schematisch dargestellt. Spur 1: Zellsediment Kin1. Spur 2: Zellsediment Kin2. Spur 3: Zellsediment Kin3. Spur 4: Zellsediment Kin4. Spur 5: Zellsediment Kin5. Spur 6: Zellsediment Kin6. Spur 7: frei. Spur 8: Positivkontrolle Zellsediment CcpA. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind jeweils das CcpA-Protein (ca. 38 kDa) in Spur 8 (A und B) und Kin3 (ca. 78 kDa) in Spur 3 (A und B).

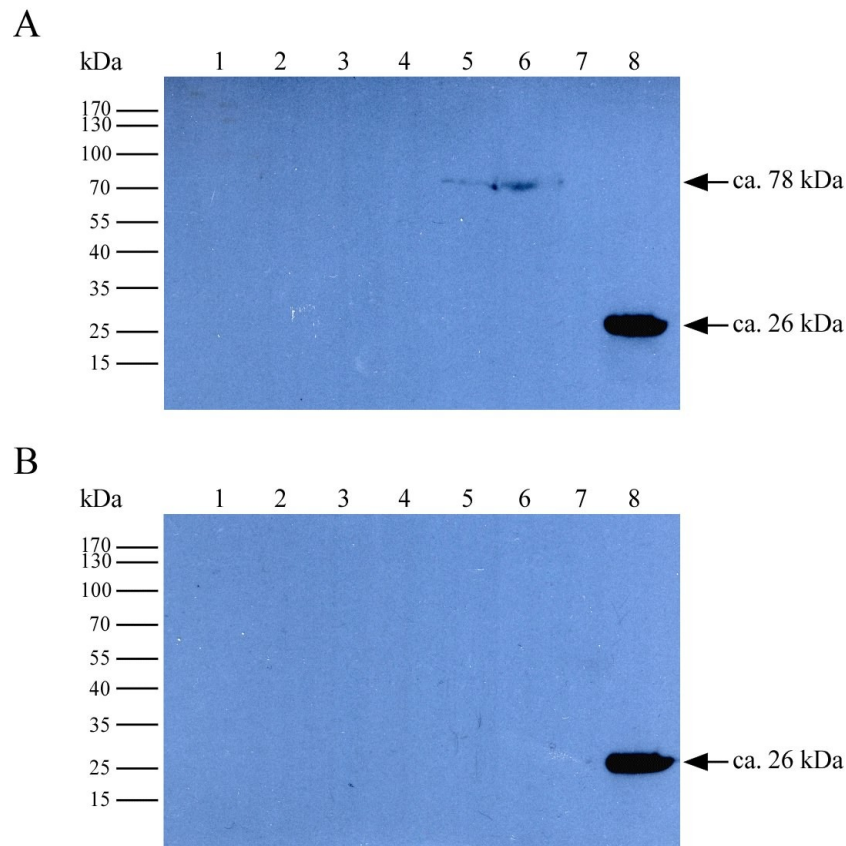
Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, ließ sich nur Kin3 (Spur 3 in A und B) im Zellsediment nach der Zellernte immunologisch nachweisen und zeigte ein Signal in dem erwarteten Größenbereich von 78 kDa (vgl. Tab. 13). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Zellen eine halbe Stunde oder 4 h nach Induktion der Genexpression mit IPTG geerntet worden waren. Das als Positivkontrolle überproduzierte CcpA-Protein war in beiden Fällen im erwarteten Bereich von ca. 38 kDa detektierbar, wobei in B die Geltasche beschädigt war und somit auch in Spur 7 das CcpA-Protein zu erkennen ist. Die Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3), der das Plasmid pRARE mit Genen für in *E. coli* selten genutzte tRNAs trägt, schien bei dieser Vorgehensweise der Überexpression keine Verbesserung der Genexpression zu bewirken, da ansonsten keine der anderen Kinasen nachgewiesen werden konnten. Da allerdings Kin3 wieder nur im Zellsediment gefunden werden konnte, war der Verdacht naheliegend, dass das Protein evtl. Einschlusskörperchen bildete, die im Rohextrakt nicht nachweisbar sind.

Im folgenden sollte deshalb eine andere Vorgehensweise für die Überexpression der Kinasen getestet werden (s. 2.12.1.3), die bereits für das Protein Rgg3 aus *Streptococcus agalactiae* (s. 3.4.6.1) erfolgreich war (persönliche Mitteilung von Beate Schaller). Dieses Protein scheint aufgrund seiner exzessiven Synthese im verwendeten Überexpressionsstamm *E. coli* ER2566 Einschlusskörperchen zu bilden. Ein derartiges Verhalten, zumindest bei der in dieser Arbeit untersuchten Kinase Kin3, konnte nicht ausgeschlossen werden. Auch für die anderen Kinasen, deren genauen Hintergründe für ihre Toxizität bzw. für die fehlende Expression der entsprechenden Gene ebenso unklar sind, wurde diese Methode angewandt.

Die *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3)-Zellen mit den entsprechenden, für die verschiedenen Kinasen kodierenden pET28a-Konstrukten und *E. coli* ER2566 mit pET28a_Rgg3 (vgl. Tab. 2, als Kontrolle für die Induktion) wurden im 250-ml-Maßstab in TB-Medium angezogen und 3 h bei 28 °C inkubiert. Nach Induktion der Genexpression mit 0,5 mM IPTG erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 18 °C unter langsamem Schütteln. Als Kontrolle wurde jede Kultur doppelt angeimpft, um eine nicht induzierte Kontrollkultur in den anschließenden Experimenten mitführen zu können. Anschließend wurden die Zellen wie gewohnt geerntet (s. 2.12.1.3). Die Kontrolle der optischen Dichte vor Induktion und vor der Zellernte bestätigte das bereits in 3.4.1.1 beobachtete Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Kulturen mit Ausnahme der Kultur, die Kin5 überproduzieren sollte. Auch diese *E. coli*-Kultur zeigte diesmal einen Wachstumsnachteil, der sich in einer unveränderten optischen Dichte vor und nach Induktion äußerte (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrolle diente eine *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3)-Kultur, die den leeren, d. h. kein für ein Protein kodierendes Gen enthaltenden Überexpressionsvektor pET-28(a)+ (pET28a_leer) trug. Das Protein Rgg3

wurde analog zu 3.4.6.1 als Positivkontrolle überexprimiert. Wieder wurde von allen Proben nach dem Ernten der Zellen ein Teil des Zellsediments mit 1 x Protein-Ladepuffer versetzt. Im Zellsediment sollten auf jeden Fall alle Proteine nachgewiesen werden können, die evtl. gebildet worden waren. Es folgte eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.12.6) und analog zu 2.12.9 und 2.12.10 „Western blot“-Experimente. Die Ergebnisse der „Western blot“-Experimente sind in folgender Abbildung 25 zu sehen.

Abbildung 25 (nächste Seite): „Western blot“-Experimente mit spezifischen Antikörpern gegen 6xHis-Reste und Proben aus einer modifizierten (s. Text) heterologen Überexpression der von CAC0323, CAC0323-trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903-trunc und CAC2730 kodierten Proteine Kin1-6 in *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) mittels des Überexpressionsplasmids pET-28(a)+. **A:** Der auf dem Gel aufgetragene Protein-Größenmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“) ist neben Spur 1 schematisch dargestellt. Spur 1: Zellsediment Kin1 (nicht induziert). Spur 2: Zellsediment Kin1 (induziert). Spur 3: Zellsediment Kin2 (nicht induziert). Spur 4: Zellsediment Kin2 (induziert). Spur 5: Zellsediment Kin3 (nicht induziert). Spur 6: Zellsediment Kin3 (induziert). Spur 7: Überexpression pET28a_(leer) als Negativkontrolle. Spur 8: Positivkontrolle Rgg3-Protein. **B:** Der auf dem Gel aufgetragene Protein-Größenmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“) ist neben Spur 1 schematisch dargestellt. Spur 1: Zellsediment Kin4 (nicht induziert). Spur 2: Zellsediment Kin4 (induziert). Spur 3: Zellsediment Kin5 (nicht induziert). Spur 4: Zellsediment Kin5 (induziert). Spur 5: Zellsediment Kin6 (nicht induziert). Spur 6: Zellsediment Kin6 (induziert). Spur 7: Überexpression pET28a_(leer) als Negativkontrolle. Spur 8: Positivkontrolle Rgg3-Protein. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind das Rgg3-Protein (ca. 26 kDa) in Spur 8 (A und B) und Kin3 (induziert, ca. 78 kDa) in Spur 6 (A).



Erwartungsgemäß ließ sich das Rgg3-Protein, das als Kontrolle auf die Vorgehensweise während der Überexpression überproduziert worden war, mit einer Größe von ca. 26 kDa (s. 3.4.6.1) in beiden mit spezifischen Antikörpern gegen 6x-Histidinreste inkubierten SDS-Gelen nachweisen (jeweils Spur 8 in 25 A und B). Dagegen wurde durch die Überexpression von pET28a_leer wie erwartet kein Protein gebildet (jeweils in Spur 7 von 25 A und B). Wie bereits in vorangegangenen Experimenten, konnte nur Kin3 (Spur 6 in 25 A) mit einer erwarteten Größe von ca. 78 kDa im Zellsediment nach der Ernte der Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der kaputten Geltasche in Spur 6 in 25 A war beim Beladen ein Teil der Probe in die benachbarte Tasche gelaufen, was die leichte Bande in Spur 5 des selben Gels erklärt. Keine der anderen Kinasen konnten detektiert werden.

Somit scheint die verlangsamte Transkriptionsrate während des Wachstums der *E. coli*-Überexpressions-Kulturen keinen Einfluss auf die Bildung bzw. den anschließenden Nachweis der Proteine zu haben.

3.4.2 Phosphorylierung von Spo0A

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die gebildete Menge der Kinasen in den genannten Überexpressionsversuchen für einen Nachweis in einem „Western blot“-Experiment zu gering war, wurden Rohextrakte der verschiedenen Überexpressions-Kulturen direkt in einen Phosphorylierungsassay mit aufgereinigtem Spo0A eingesetzt.

Dafür wurden die *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3)-Zellen mit den entsprechenden, für die verschiedenen Kinasen kodierenden pET28a-Konstrukten und mit pET28a_leer in jeweils 250 ml TB-Medium angeimpft und wie in 2.12.1.3 beschrieben erst 3 h bei 28 °C und nach darauf folgender Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht bei 18 °C inkubiert. Alle Stämme wurden zusätzlich für eine jeweilige nicht induzierte Kontrolle den gleichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Das für die Phosphorylierung wichtige Spo0A-Protein wurde, wie in 3.4.5 beschrieben, überproduziert. Als Positivkontrolle im Phosphorylierungsversuch sollten die beiden Proteine Hpr und HprK/P dienen (Überexpression s. 3.4.6.2). Nach der Zellernte (s. 2.12.1.3) erfolgte analog zu 2.12.2 die Herstellung der Rohextrakte. Die Proteine Spo0A, Hpr und HprK/P wurden anschließend über eine Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure (s. 2.12.3) aufgereinigt und einer Dialyse unterzogen (s. 2.12.4.1). Alle anderen Proteine (bzw. die nicht induzierten Kontrollen) wurden in Form von Rohextrakten in den Phosphorylierungsversuch, wie in 2.12.12 beschrieben, eingesetzt.

Die radioaktiv durchgeführten Experimente zeigten auf dem am Ende entwickelten Film keine Phosphorylierung von Spo0A an. An den Ergebnissen konnte auch das Weglassen der Aufreinigung der Phosphorylierungsansätze vor der Denaturierung über „MicroSpin™ G-25“-Säulen (s. 2.5.9) nichts ändern. Zudem hatte die Aufreinigung der Proteinrohextrakte (bzw. der nicht induzierten Kontrollen) über PD10-Säulen (s. 2.12.4.2) keinen Einfluss auf das Experiment. Unglücklicherweise fiel auch die Phosphorylierung von Hpr durch HprK/P negativ aus, die aber bereits in vorangegangenen Experimenten von Niklas Nold erfolgreich verlaufen war. Wie alle anderen Ansätze war auch die Hpr-Phosphorylierung strikt nach Anleitung durchgeführt worden. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Ein sich daran zur Kontrolle anschließendes „Western blot“-Experiment mit Zellsedimenten, die nach der Zellernte erhalten worden waren, bestätigte aber die Überproduktion der Proteine Spo0A, Hpr, HprK/P und Kin3 (Daten nicht gezeigt).

3.4.3 Nachweis der Transkripte von CAC0323, CAC0323_trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903_trunc, CAC2730 und CAC2071 mittels RT-PCR

Da weder der Nachweis der Überproduktion noch die Untersuchungen zum Phosphorylierungsverhalten der verschiedenen Kinasen Kin1-6 erfolgreich verlaufen waren, sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Gene der Kinasen nach Induktion mit IPTG überhaupt transkribiert werden.

Hierfür wurden die *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3)-Zellen mit den entsprechenden, für die verschiedenen Kinasen kodierenden pET28a-Konstrukten und *E. coli* BL21 (DE3) mit dem für Spo0A kodierenden Plasmid pSOA (vgl. Tab. 2) im 5-ml-Maßstab in LB-Medium angezogen. Hierbei wurden alle Stämme doppelt angeimpft, um später auch in nicht induzierten Kontrollkulturen die Transkription der verschiedenen Gene zu untersuchen. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 1 wurde in allen für die Induktion vorgesehenen Kulturen die Expression der gewünschten Gene durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurden alle Kulturen abzentrifugiert und analog zu 2.4.4 die RNA mit dem „RNeasy™-Mini-Kit“ daraus isoliert. Ein anschließender zusätzlicher DNase-Verdau (s. 2.4.5) und eine Standard-Probe-PCR (s. 2.8.1) mit „Ready-to-Go PureTaq™ PCR-Beads“ und spezifischen Oligonukleotiden (vgl. Tab. 15) bestätigten die vollständige Elimination von unerwünschter DNA. Mit den in folgender Tabelle 15 aufgeführten Oligonukleotiden wurden analog zu 2.8.4 die RT-PCR-Reaktionen durchgeführt. Zu jeder Probe wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle hergestellt. Für eine Negativkontrolle enthielt der Ansatz statt dem Enzym Reverse Transkriptase nur Wasser, war aber ansonsten wie ein normaler RT-PCR-Ansatz zusammengesetzt. Der Nachweis des Transkripts eines sog. „house keeping gene“ von *E. coli* sollte als Positivkontrolle dienen, ob die Methode der RT-PCR an sich funktioniert. Hierfür war das *gyrA*-Gen aus *E. coli* ausgewählt worden. Mit dem „primer“-Paar *gyrA_fw* und *gyrA_rev* (Nr. 64 und 65 aus Tab. 3) sollte ein 537 Bp großes PCR-Fragment amplifiziert werden, falls die Durchführung der RNA-Isolierung und der RT-PCR fehlerfrei verlaufen war.

Tabelle 15: „primer“ für den Nachweis der Transkripte von CAC0323, CAC0323_trunc, CAC0437, CAC0903, CAC0903_trunc, CAC2730 und CAC2071 aus *C. acetobutylicum* in *E. coli* über RT-PCR.

Protein (dafür kodierendes Gen)	vorwärts-„primer“ (Nr. aus Tab. 3)	rückwärts-„primer“ (Nr. aus Tab. 3)	PCR-Produkt [Bp]
Kin1 (CAC0323)	P0323-Bam_fw (35)	P0323_RTrev (58)	573
Kin2 (CAC032_trunc)	P0323-trunc-Bam_fw (36)	0323-Mitte_rev (46)	389
Kin3 (CAC0437)	P0437-Bam_fw (38)	P0437_RTrev (59)	482
Kin4 (CAC0903)	P0903-Bam_fw (40)	P0903_RTrev (60)	630
Kin5 (CAC0903_trunc)	P0903-trunc-Bam_fw (41)	0903-Mitte_rev (50)	496
Kin6 (CAC2730)	P2730-Bam_fw (43)	P2730_RTrev (61)	613
Spo0A (CAC2071)	Spo0A_fw (62)	Spo0A_rev (63)	627

_trunc = N-terminal verkürzte Varianten der Gene CAC0323 und CAC0903.

In folgender Abbildung 26 sind die Ergebnisse der verschiedenen RT-PCR-Reaktionen gezeigt.

Abbildung 26 (nächste Seite): Nachweis der Transkripte von CAC0323 (A), CAC0323_trunc (B), CAC0437 (C), CAC0903 (D), CAC0903_trunc (E), CAC2730 (F) und CAC2071 (G) aus *C. acetobutylicum* in *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) mittels RT-PCR. Aus *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3)-Zellen mit pET28a_CAC0323, pET28a_CAC0323-trunc, pET28a_CAC0437, pET28a_CAC0903, pET28a_CAC0903-trunc und pET28a_CAC2730 und aus *E. coli* BL21 (DE3) mit pSOA wurde Gesamt-RNA mit Hilfe des „RNeasy™-Mini-Kit“ isoliert. Bei allen Stämmen wurde jeweils eine nicht induzierte Kontrollkultur mitgeführt. Spur 1: jeweils Größenstandard „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“. Spur 2: RT-PCR mit RNA aus der jeweiligen nicht induzierten Kontrollkultur als Matrize. Spur 3: Positivkontrolle = Nachweis des *gyrA*-Gens aus *E. coli* mit RNA aus der jeweiligen nicht induzierten Kontrollkultur als Matrize. Spur 4: Negativkontrolle = RT-PCR mit Wasser statt Enzym Reverse Transkriptase und RNA aus der jeweiligen nicht induzierten Kontrollkultur als Matrize. Spur 5: RT-PCR mit RNA aus der jeweiligen induzierten Kultur als Matrize. Spur 6: Positivkontrolle = Nachweis des *gyrA*-Gens aus *E. coli* mit RNA aus der jeweiligen induzierten Kultur als Matrize. Spur 7: Negativkontrolle = RT-PCR mit Wasser statt Enzym Reverse Transkriptase und RNA aus der jeweiligen induzierten Kultur als Matrize. Die Größen der erwarteten Banden sind dem Text und Tab. 15 zu entnehmen.

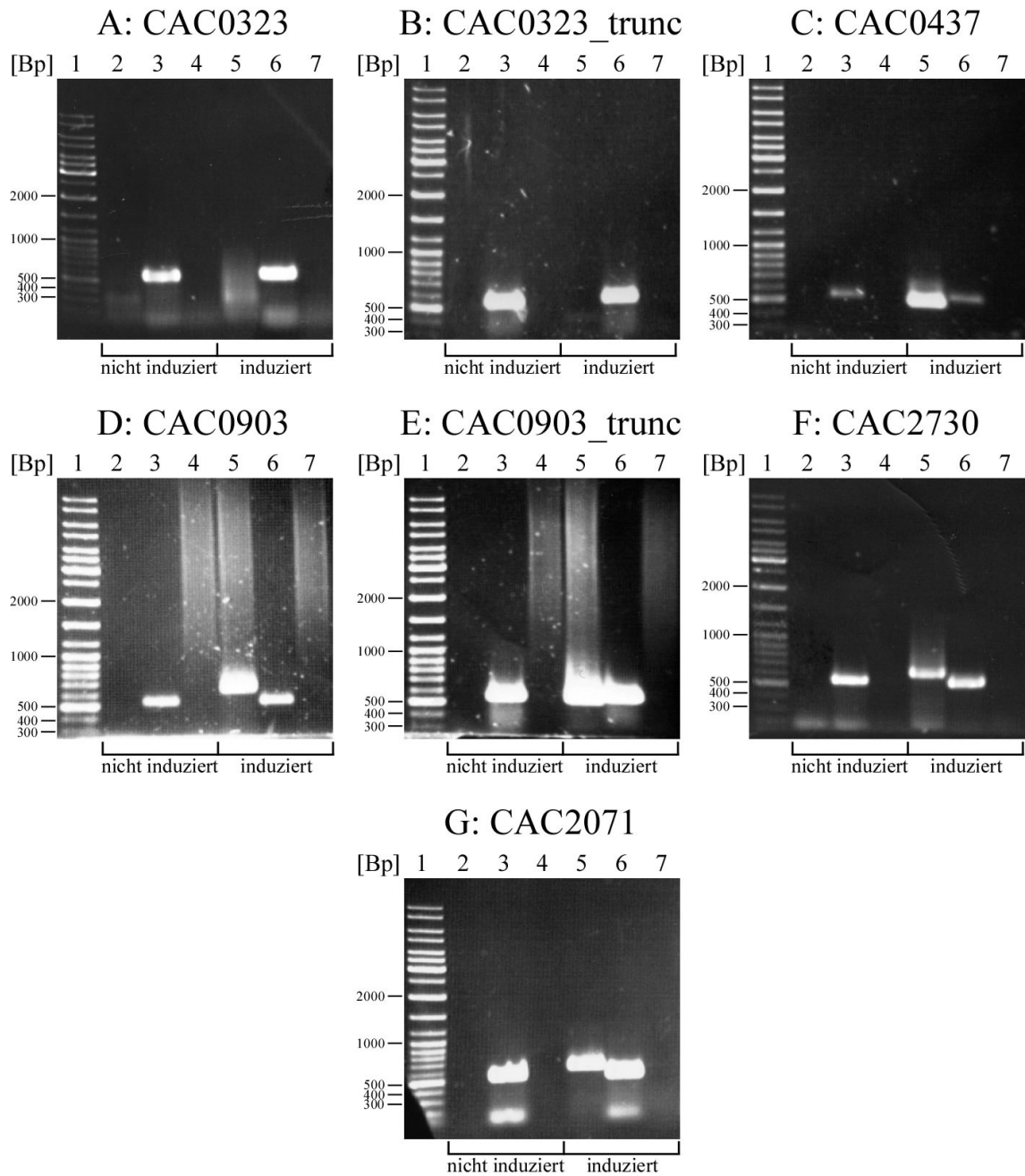


Abbildung 26 ist zu entnehmen, dass in allen Negativkontrollen (jeweils Spuren 4 und 7 in A-G) auch erwartungsgemäß keine Banden zu sehen waren, d. h. alle RNA-Proben waren DNA-frei. Das *gyrA*-Gen aus *E. coli* konnte ebenfalls den Erwartungen nach mit jeder RNA-Probe nachgewiesen werden (Bande mit der Größe von ca. 540 Bp) und zeigte somit die korrekte

Durchführung der RT-PCR und die gute Qualität der isolierten RNA an (jeweils Spuren 3 und 6 in A-G).

Das Gen CAC0323, das nach Induktion mit IPTG von dem T7-Promoter aus transkribiert werden sollte, konnte mit der RT-PCR nicht nachgewiesen werden, eine Bande von ca. 570 Bp fehlt (vgl. Abb. 26 A, Spur 5). In der nicht induzierten Kontrollkultur von *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) mit pET28a_CAC0323 war wie erwartet keine Bande zu erkennen (vgl. Abb. 26 A, Spur 2). Dagegen zeigte eine schwache Bande bei ca. 400 Bp in Abb. 26 B, Spur 5 den Nachweis einer Transkription der N-terminal verkürzten Variante von CAC0323 (CAC0323_trunc) nach erfolgreicher Induktion der Genexpression an. Die RT-PCR mit RNA der nicht induzierten Kontrollkultur fiel negativ aus (Spur 2). In 26 C ist das Ergebnis der RT-PCR zum Nachweis eines Transkripts von CAC0437, das für die Kin3 kodiert, zu sehen. Auch hier zeigt eine Bande im erwarteten Größenbereich von etwa 480 die erfolgreiche Transkription des Gens nach Induktion mit IPTG an (Spur 5). Dagegen wird das Gen vor Induktion nicht abgelesen (Spur 2). Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch bei dem Nachweis der Transkription der Gene CAC0903 und CAC0903_trunc (vgl. Abb. 26 D und E). Erst nach Induktion mit IPTG wurden beide Gene von dem im pET-28(a)+-Vektor enthaltenen T7-Promoter aus abgelesen. Banden im erwarteten Größenbereich von 630 Bp (Kin4) bzw. ca. 500 Bp (Kin5) in der Spur 5 von Abb. 26 D bzw. E belegen dies. In 26 F ist das Ergebnis der RT-PCR zum Nachweis eines Transkripts von CAC2730, das für Kin6 kodiert, zu sehen. Hier zeigt eine Bande im erwarteten Größenbereich von ca. 600 Bp an, dass das Gen nach Induktion mit IPTG von dem im pET-28(a)+-Vektor enthaltenen T7-Promoter aus abgelesen wurde (Spur 5). Vor Induktion wurde das Gen nicht abgelesen (fehlende Bande in Spur 2).

Ebenfalls den Erwartungen entsprechend verliefen die RT-PCR-Ansätze für das Gen CAC2071, das für das Spo0A-Protein aus *C. acetobutylicum* kodiert. Wie in Abb. 26 G, Spur 5 zu sehen ist, wurde das *spo0A*-Gen nach Induktion mit IPTG abgelesen, was durch den Nachweis eines RT-PCR-Produkts der Größe von ca. 630 Bp belegt werden kann. Der Nachweis eines Transkripts vor Induktion war negativ (fehlende Bande in Spur 2).

Die Ergebnisse dieser RT-PCR-Experimente zusammenfassend, konnten die Transkripte aller Kinasen, mit Ausnahme von Kin1, nach Induktion der Genexpression mit IPTG nachgewiesen werden.

3.4.4 Verwendung des „ClosTron® Gene Knockout System“ zur Identifizierung der für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortlichen Kinase

Da die Überproduktion der vier für die Phosphorylierung von Spo0A in Frage kommenden Kinasen und auch die Untersuchungen zum Phosphorylierungsverhalten der verschiedenen Kinasen nicht erfolgreich verlaufen waren, sollte im Folgenden ein neuartiges System zur Herstellung von „knockout“-Mutanten angewendet werden. Durch gezieltes Ausschalten der entsprechenden Kinase-Gene sollte in sich daran anschließenden Sporulationsstudien das Protein identifiziert werden können, das Spo0A phosphorylieren kann. In diesem Falle würde ein Defekt in der Sporulation anzeigen, dass das richtige Protein ausgeschaltet worden ist.

Das „ClosTron® Gene Knockout System“ (s. 2.11) ist eine Methode, mit der clostridiale Gene hoch effizient, gezielt und v. a. dauerhaft ausgeschaltet werden können [Frazier et al., 2003]. Im Gegensatz zur konventionellen DNA-Transposon-Mutagenese funktioniert das „ClosTron® Gene Knockout System“ Sequenz-spezifisch und nicht zufällig. Hierbei bedient es sich sog. Gruppe-II-Introns, deren Sequenz unter Berücksichtigung verschiedener Voraussetzungen für die Insertion in beinahe jedes beliebige Gen verändert werden kann. Diesen Prozess bezeichnet man als „retrohoming“ [Zhong et al., 2003]. Im „ClosTron® Gene Knockout System“ ist das Gruppe-II-Intron auf dem Plasmid pMTL007 kodiert, wobei dessen Expression von einem *fac*-Promoter aus mit IPTG induziert werden kann [Heap et al., 2007]. Außerdem auf dem Plasmid vorhanden ist das sog. IEP („intron encoded protein“) oder auch LtrA-Protein genannt. Im Gegensatz zum „TargeTron® Gene Knockout System“, das für das Ausschalten von Genen in z. B. *E. coli* vorgesehen ist, befindet sich das Gen für das LtrA-Protein im pMTL007 außerhalb des Gruppe-II-Introns. Dies verhindert nach erfolgreicher Integration des Gruppe-II-Introns ins Zielgen das Wiederausschneiden des Introns und ist somit für eine beständige „knockout“-Mutante verantwortlich. Das LtrA-Protein hat zudem insgesamt vier weitere Funktionen, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

Das Gruppe-II-Intron besitzt spezifische, zueinander komplementäre Sequenzelemente (IBS1/2, δ und EBS1/2, δ'). Nach Induktion mit IPTG kommt es zur Transkription des Gruppe-II-Introns und zur Transkription und Bildung des LtrA-Proteins. Die komplementären Sequenzelemente des Gruppe-II-Introns sind für das spezielle Spleißen der Intron-RNA durch das LtrA-Protein (Maturase-Aktivität) notwendig. Das LtrA-Protein und die speziell gespleißte Intron-RNA bilden daraufhin den sog. Ribonukleoproteinkomplex (RNP), der bestimmte chromosomale Sequenzelemente erkennt. Dabei erkennt das LtrA-Protein zuerst 4 spezielle Nukleotide der chromosomalen DNA und bindet daran. Dadurch wird die doppelsträngige DNA lokal entwunden und die Intron-RNA hat die Möglichkeit, mit drei

kurzen, spezifischen Regionen (insgesamt 15 Nukleotide) der genomischen DNA zu paaren. Diese drei kurzen Sequenzelemente der DNA-Zielsequenz („intron-binding sites“ 1 und 2 (IBS1 und IBS2) und δ') werden hierbei von den komplementären Sequenzelementen in der Intron-RNA („exon-binding sites“ 1 und 2 (EBS1 und EBS2) und δ) erkannt. Die Intron-RNA inseriert daraufhin autokatalytisch direkt in den oberen Strang. Die Endonuklease-Aktivität des LtrA-Proteins schneidet den gegenüberliegenden Strang, wobei ein 3'-Überhang erhalten bleibt, der im folgenden durch die Reverse Transkriptase-Aktivität des LtrA-Proteins als „primer“ für die cDNA-Synthese der Intron-RNA verwendet wird. Wirts-eigene Reparatursysteme vervollständigen daraufhin den DNA-Doppelstrang. Die Integration ist demnach nur erfolgreich, wenn die Intron-RNA komplementäre Sequenzelemente zum gewünschten Integrationsort trägt. Mit Hilfe eines Computer-Algorithmus können die Erkennungssequenzen des LtrA-Proteins und der Intron-RNA im Zielgen gesucht und durch eine einfache Ein-Schritt-SOE-PCR angepasst werden. Dabei dürfen die Sequenzen für eine effiziente Insertion der Intron-RNA nur in geringem Maße variieren [Zhong et al., 2003].

Für die effiziente Selektion der Integrationsmutanten sorgt eine modifizierte *ermB*-Resistenzkassette. Diese Selektion beruht auf dem sog. RAM-(„retrotransposition-activated selectable **m**arker“) System. Hierbei wurde das für Erythromycinresistenz kodierende Gen mit eigenem Promoter in umgekehrter Orientierung in das Gruppe-II-Intron kloniert. Dieses Resistenzgen wird allerdings sehr effizient von dem selbst-spleißenden Gruppe-I-Intron *td* unterbrochen, das wiederum in der gleichen Orientierung wie das Gruppe-II-Intron in die Resistenzkassette eingefügt wurde. Erst nach erfolgreicher Integration des Gruppe-II-Introns ins Zielgen und nach Transkription des Gruppe-II-Introns nach Induktion wird auch das Gruppe-I-Intron *td* abgelesen. Dieses schneidet sich daraufhin aus dem Resistenzgen aus und aktiviert so die Antibiotikaresistenz. Der Vektor pMTL007 enthält neben dem bereits erwähnten IPTG-induzierbaren *fac*-Promoter und der modifizierten *ermB*-Resistenzkassette ein pCB102-basierendes Replikon für die Replikation des Plasmids in *C. acetobutylicum*. In folgender Abbildung 27 ist der Vektor pMTL007 dargestellt.

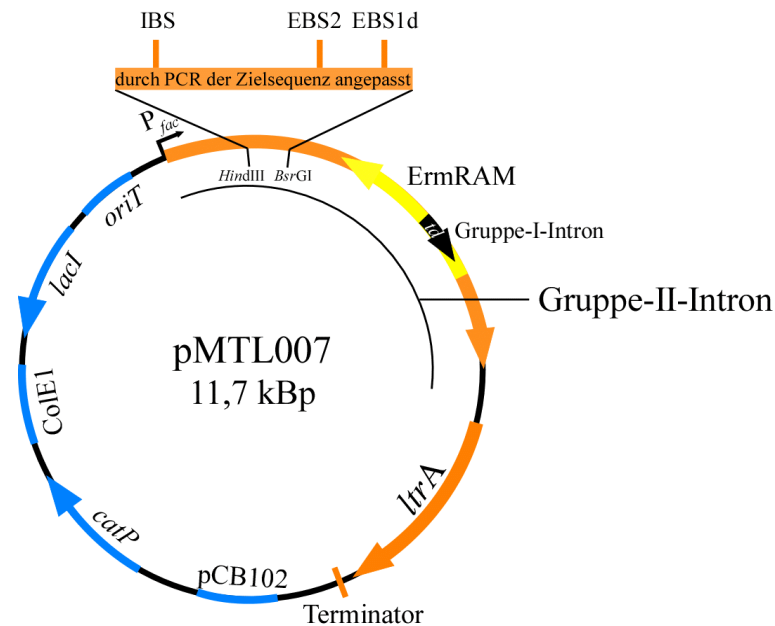


Abbildung 27: Plasmid pMTL007. Bestandteil des „ClosTron® Gene Knockout System“, das mittels Gruppe-II-Introns zum spezifischen und permanenten Ausschalten clostridialer Gene verwendet wird. Für die spezifische Integration eines Gruppe-II-Introns in ein bestimmtes Zielgen werden die Sequenzbereiche IBS, EBS2 und EBS1d der Gruppe-II-Intron-DNA mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide und einer Ein-Schritt-SOE-PCR der Zielsequenz angepasst. Über die Schnittstellen *HindIII* und *BsrGI* wird der ca. 350 Bp große und dem Zielgen angepasste Sequenzabschnitt in den Vektor pMTL007 kloniert, der den restlichen Teil des Gruppe-II-Introns beinhaltet. P_{fac} : mit IPTG induzierbarer *fac*-Promoter. ErmRAM: modifizierte *ermB*-Resistenzkassette. *td*: Gruppe-I-Intron zur Zerstörung des Erythromycinresistenzgens. *ltrA*: Gen für LtrA-Protein. pCB102: Replikon aus *C. beijerinckii*. *catP*: Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase. ColE1: „origin“ für die Replikation des Plasmids in *E. coli*. *lacI*: Gen für Lac-Repressor. *oriT*: „origin of transfer“, wichtig für den Transfer des Plasmids durch Konjugation von pMTL007 in den Zielorganismus. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Nach Transformation von *C. acetobutylicum* mit dem gezielt in der Intron-DNA-Sequenz veränderten Plasmid pMTL007 und erfolgreichem Nachweis der Integration über PCR (s. 2.11) können in weiterführenden Experimenten die Folgen der Integration des Gruppe-II-Introns ins Zielgen untersucht werden.

Das „ClosTron® Gene Knockout System“ wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, die bereits in 3.4 als potentielle Kandidaten für die Phosphorylierung von Spo0A beschriebenen Kinasen zu untersuchen. Hierfür sollten die für die verschiedenen Kinasen

kodierenden Gene CAC0323, CAC0437 und CAC0903 durch Integration eines Gruppe-II-Introns ausgeschaltet werden und die daraus folgenden Auswirkungen auf die Sporulationsfähigkeit von *C. actobutylicum* zur Identifizierung der für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortlichen Kinase beitragen. Zusätzlich sollte mit dieser Methode auch das Gen CAC3319 (vgl. Tab. 9) untersucht werden, dessen Protein zwar laut Paredes et al. (2005) nicht als potentielle Phosphorylierungskinase von Spo0A in Frage kommt (s. 3.4), aber trotz allem für eine „orphan“-Histidin-Kinase kodiert und kein Gen für einen „response regulator“ in seiner Nachbarschaft aufweist.

Mit Hilfe eines Computer-Algorithmus konnten die Erkennungssequenzen des LtrA-Proteins und der Intron-DNA im jeweiligen Zielgen gesucht werden, wobei für jedes Gen zwei mögliche Integrationsstellen ausgewählt wurden. Ein durch das Computer-Programm ermittelter, als „E-value“ bezeichneter Wert gab dabei die Wahrscheinlichkeit einer Integration des Gruppe-II-Introns an ausgewählter Stelle an. Eine Integration an einer Stelle mit niedrigem „E-value“ ist Herstellerangaben zu Folge wahrscheinlicher als eine Integration an einer Position mit höherem Wert. Dabei ist laut Hersteller eine Integration nur bis zu einem Wert von $< 0,5$ effizient. Für die Wahl der Integrationsstellen wurden deshalb Insertionsstellen mit den niedrigsten „E-values“ in den ersten 500 Basenpaaren des jeweiligen Gens ausgewählt. Die ausgesuchten Positionen und die dazugehörigen „E-values“ sind in folgender Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Integrationsstellen für jeweils ein Gruppe-II-Intron in die Gene CAC0323, CAC0437, CAC0903 und CAC3319 und die zugehörigen „E-values“.

Gen der „orphan“- Histidin-Kinase	Integration des Gruppe-II-Intron im jeweiligen Gen zwischen den Basen an den Positionen	„E-value“
CAC0323	420 und 421	0,012
	186 und 187	0,231
CAC0437	51 und 52	0,153
	246 und 247	0,181
CAC0903	230 und 231	0,237
	31 und 32	0,262
CAC3319	257 und 258	0,154
	291 und 292	0,224

Durch eine einfache Ein-Schritt-SOE-PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden -IBS, -EBS2 und -EBS1d (vgl. Tab. 3, Nr. 66-89) konnten dann die Erkennungssequenzen für die Intron-RNA dem gewünschten Zielgen angepasst werden. In folgender Abbildung 28 ist die Mutagenese der Intron-DNA am Beispiel für die Insertion des Gruppe-II-Introns in das Gen CAC0323 zwischen Position 186 und 187 dargestellt.

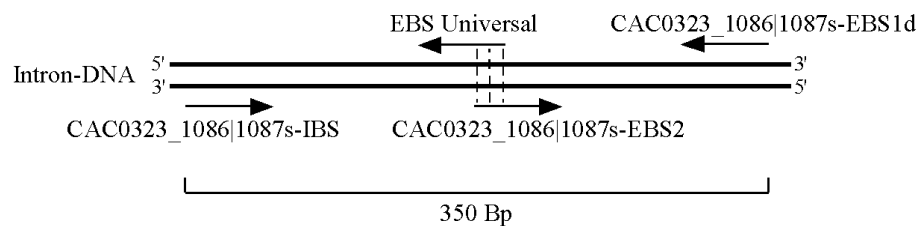


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Ein-Schritt-SOE-PCR für die Anpassung der Intron-DNA an die Zielsequenz am Beispiel für die Insertion des Gruppe-II-Intron in das Gen CAC0323 zwischen Position 186 und 187. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die beiden verwendeten Oligonukleotidpaare CAC0323_1086|1087s-IBS/EBS Universal (im „ClosTron® Gene Knockout System-Kit“ enthalten) und CAC0323_1086|1087s-EBS2/CAC0323_1086|1087s-EBS1d. Über einen komplementären Bereich (gestrichelte Linien) des EBS Universal und CAC0323_1086|1087s-EBS2 können die Einzelfragmente zu einem 350 Bp großen Fragment fusioniert werden, das anschließend über die Schnittstellen *HindIII* und *BsrGI* in den Vektor pMTL007 kloniert werden kann.

Die Ein-Schritt-SOE-PCR wurde analog zu 2.11.1 durchgeführt. Die Sequenz der Intron-DNA konnte dadurch allen gewünschten Insertionsstellen der einzelnen Gene erfolgreich angepasst werden. Eine Ausnahme stellte nur CAC3319 dar. Für dieses Gen konnte die Intron-DNA nur für eine Insertionsstelle an Position 257 angepasst werden.

Da der hier verwendete Vektor pMTL007 bereits ein inseriertes DNA-Fragment trug, musste dieses vor der Ligation mit dem veränderten Intron-Fragment durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *HindIII* und *BsrGI* und einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.6.1) abgetrennt und der linearisierte, etwa 11,7 kBp große Vektor aus dem Gel aufgereinigt (s. 2.5.7) werden. Nach Restriktionsspaltung der nach der Ein-Schritt-SOE-PCR erhaltenen PCR-Produkte mit *HindIII* und *BsrGI* und der Dephosphorylierung des Vektors (s. 2.11.2) wurde das jeweilige 350 Bp große Fragment des Gruppe-II-Introns über die genannten Schnittstellen in den Vektor pMTL007 gebracht (s. 2.11.3). Folgende Tabelle 17

stellt die Bezeichnungen der erhaltenen Plasmide je nach Integrationsort im jeweiligen Gen dar.

Tabelle 17: Plasmidbezeichnung nach Ligation der mutierten Intron-DNA-Sequenzen in den Vektor pMTL007 und die entsprechenden Integrationsorte (vgl. auch Tab. 16).

Plasmid	Integration des Gruppe-II-Intron im jeweiligen Gen zwischen den Basen an den Positionen
pMTL_CAC0323-1086	186 und 187
pMTL_CAC0323-1320	420 und 421
pMTL_CAC0437-1851	51 und 52
pMTL_CAC0437-2046	246 und 247
pMTL_CAC0903-1369	31 und 32
pMTL_CAC0903-1568	230 und 231
pMTL_CAC3319-257	257 und 258

Die Zahlen am Ende der Plasmidbezeichnungen spiegeln die Position der möglichen Integration in den Sequenzen wieder, die in den Such-Algorithmus eingegebenen worden waren. Diese Sequenzen bestanden aus einer Aneinanderreihung der ersten 900 Basen jedes zu untersuchenden Gens.

Nach Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen (s. 2.9.1) erfolgte die Kontrolle der daraus präparierten Plasmide über Restriktionsspaltung (s. 2.7.1) und Sequenzierung (s. 2.8.7) mit den Oligonukleotiden pMTL007_F und pMTL007_R (vgl. Nr. 90 und 91 aus Tab. 3).

Um die als fehlerfrei sequenzierten Plasmide in *C. acetobutylicum* transformieren zu können, mussten diese zum Schutz vor der in *C. acetobutylicum* existierenden Restriktionsendonuklease Cac824I zuerst spezifisch methyliert werden (s. 2.9.4.3). Daher wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen transformiert, die das Plasmid pANS1 (mit der Information für die Methyltransferase Φ 3T des Phagen Φ 3TI; [Böhringer, 2002] trugen (s. 2.11.4). Nach erfolgreicher Transformation der methylierten Plasmide in *C. acetobutylicum* (s. 2.11.4) konnten nach 2 Tagen Inkubation einzelne Kolonien gepickt und die Induktion der Integration analog zu 2.11.5 durchgeführt werden. Obwohl sowohl nach der Transformation der Plasmide in den Zielorganismus als auch nach der Induktion der Gruppe-II-Intron-Integration Kolonien auf den entsprechenden Agarplatten

erhalten worden waren, konnten diese aufgrund von Schwierigkeiten bei erneuter Anzucht nicht weiter verwendet werden. Es war nicht möglich, die Integration des Gruppe-II-Intron in das jeweilige Gen mit Hilfe einer Probe-PCR (s. 2.11.6) zu kontrollieren und eventuell aufschlussreiche Wachstums- bzw. Sporulationsversuche zur Identifizierung der für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortlichen Kinase(n) durchzuführen.

3.4.5 Heterologe Überexpression von Spo0A aus *C. acetobutylicum* in *E. coli*

Um die potentielle Phosphorylierungsfunktion der Kinasen aus *C. acetobutylicum* in Phosphorylierungsversuchen untersuchen zu können, musste das Regulatorprotein Spo0A in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen.

Das Protein Spo0A aus der „response regulator“-Familie ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, Teil eines regulatorischen Zwei-Komponenten-Systems und besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich aus zwei ungefähr gleich großen Domänen zusammensetzt. Am N-Terminus befindet sich eine regulatorisch wirksame Akzeptor-Domäne und am C-Terminus ist eine Effektor-Domäne lokalisiert. 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. Dieses ist für die DNA-bindende Eigenschaft des Proteins verantwortlich. 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 es Hollergschwandner, das Spo0A-Protein unter Anwendung einer 6xHis-Fusion und einer Ni-NTA Affinitätschromatographie überzuproduzieren und aufzureinigen [Hollergschwandner, 2003].

Hierfür war das für Spo0A kodierende Gen *spo0A* in den Überexpressionsvektor pET31(+) unter die Kontrolle des T7-Promoters kloniert worden [Hollergschwandner, 2003]. Auch dieser Vektor trägt einen IPTG-induzierbaren *tac*-Promoter und ein *lacI*-Gen, so dass die sich auf *E. coli* ungünstig auswirkende Basalexpression von *spo0A*, die wie erwähnt aus vorangegangenen Experimenten bekannt war [Hollergschwandner, 2003], bis zum Zeitpunkt der Induktion sehr niedrig gehalten werden konnte. Mit dem Oligonukleotid SAM-NdeI-neu war eine *NdeI*-Schnittstelle eingefügt worden, die sich nach Ligation im idealen Abstand zur Ribosomenbindestelle befand und so eine Klonierung beginnend mit dem ATG-Startkodon ermöglicht hatte. Um die Aktivität der sich am N-Terminus befindlichen und für

nachfolgende Phosphorylierungsversuche wichtigen Akzeptor-Domäne zu erhalten, war durch die Verwendung des „primer“ SAM-xhoI das Gen *spo0A* mit einer im Vektor kodierten Sequenz für 6 Histidine am C-Terminus fusioniert worden. Nach erfolgreicher Expression des Gens sollte dadurch eine Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA erleichtert werden. Das erhaltene Plasmid wurde pSOA genannt und war nach Kontrollsequenzierung in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert worden [Hollergschwandner, 2003].

Die Überproduktion von Spo0A wurde in der vorliegenden Arbeit nach einem modifizierten Protokoll von C. Hollergschwandner (2003) in 500 ml TB-Medium durchgeführt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 1,5-2 wurde die Expression von Spo0A durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Auf eine Rifampicin-Gabe nach der Induktion mit IPTG wurde verzichtet. Nach Herstellung eines Rohextraktes analog zu 2.12.2 erfolgte die Aufreinigung des von Konstrukt pSOA exprimierten Spo0Ax6His-Proteins über eine Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure (s. 2.12.3). Mit einem Imidazolgradienten, aufsteigend mit 2 x 75 mM, 2 x 100 mM und 2 x 200 mM Imidazol (Elution mit jeweils 1 ml), wurde das Protein von der Säule eluiert. Zur Kontrolle der Überexpression und Aufreinigung wurde eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wie in 2.12.6 beschrieben, durchgeführt. Mit Hilfe einer anschließenden Silber-Färbung des Gels (s. 2.12.8) konnte das Spo0A-Protein nachgewiesen werden. Die aus Sequenzdaten mit Hilfe eines im Internet verfügbaren Programms (**Sequence manipulation Suite**: http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) errechnete Proteinmasse von Spo0A (inkl. des fusionierten 6x-Histidinrests) betrug ca. 33 kDa. Ein Vergleich des aufgereinigten Proteins mit einem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Größenstandard bestätigte die Proteinmasse von ca. 33 kDa. Folgende Abbildung 29 A zeigt die mit Silbernitrat gefärbte SDS-PAGE. Das mit den sechs Histidinresten fusionierte Protein ließ sich zudem in einem „Western blot“-Experiment immunologisch nachweisen (s. 2.12.9, 2.12.10). Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 29 B dargestellt.

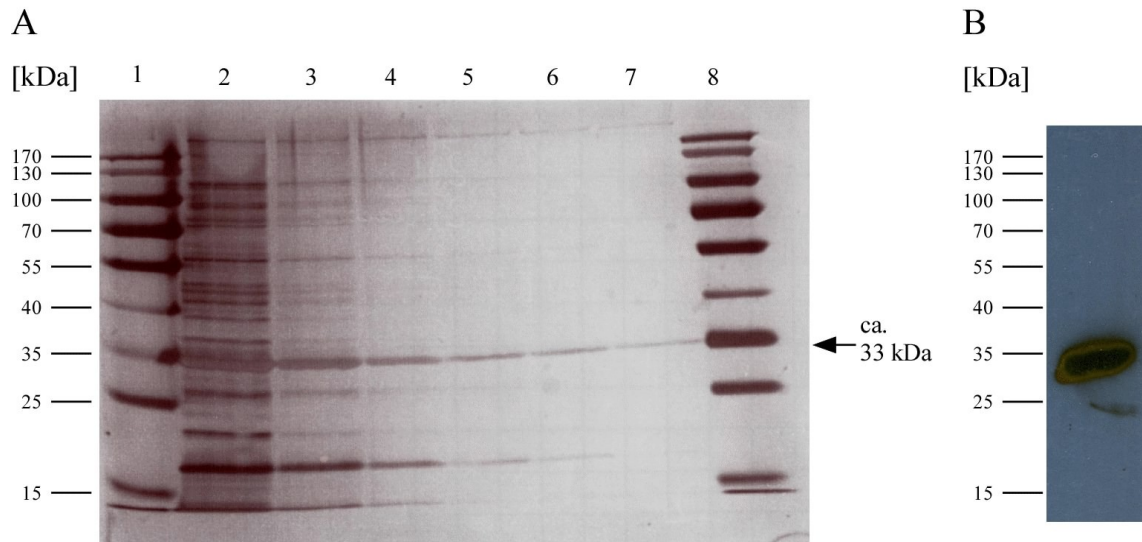


Abbildung 29: Überexpression von Spo0A. **A:** Dargestellt ist ein mit Silbernitrat gefärbtes SDS-Gel. Spuren 2, 3: Eluate mit jeweils 75 mM Imidazol. Spuren 4, 5: Eluate mit jeweils 100 mM Imidazol. Spuren 6, 7: Eluate mit jeweils 200 mM Imidazol. Spuren 1, 8: Größenstandard „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“. Die Bande bei ca. 33 kDa repräsentiert Spo0A und ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **B:** Immunologischer Nachweis von Spo0Ax6His im „Western blot“-Experiment mit spezifischen Antikörpern gegen den 6x Histidinrest.

In 29 A ist deutlich zu erkennen, dass das Protein mit einer Imidazolkonzentration von 75-200 mM eluiert werden konnte, wobei die Elution von nahezu reinem Protein erst ab einer Konzentration von 200 mM Imidazol gegeben war. Die erwartete Größe des Spo0A-Proteins von ca. 33 kDa ließ sich sowohl mit dem mit Silbernitrat gefärbten Gel als auch mit dem „Western blot“-Experiment (vgl. 29 B) bestätigen.

Analog zu 2.12.4.1 wurden die Eluate einer Dialyse unterzogen, um das Protein für weitere Versuche zu konzentrieren. Die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von „Pierce“ (s. 2.12.5) ergab für die Eluate in den Spuren 6 und 7 (Abb. 29) Werte von 27,5 µg/ml bzw. 12,5 µg/ml. Im Vergleich zu vorangegangenen Aufreinigungsversuchen von Spo0A mit Proteinkonzentrationen von ca. 500 µg/ml (Daten nicht gezeigt) erscheinen die hier angegebenen Werte sehr gering. Eine Bindung des Proteins an den Dialyseschlauch war nicht auszuschließen. Trotzdem sollte die Menge an erhaltenem Spo0A-Protein für weiterführende Phosphorylierungsversuche ausreichend sein.

3.4.6 Heterologe Überexpression von Rgg3 aus *Streptococcus agalactiae* sowie Hpr, HprK/P und CcpA aus *C. acetobutylicum* in *E. coli*

Um bei der Überexpression von Proteinen, bei denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen mit anschließender Silber-Färbung, bei „Western blot“-Experimenten und bei Phosphorylierungsversuchen entsprechende Positivkontrollen mitführen zu können, wurden zusätzlich die Proteine Rgg3 aus *Streptococcus agalactiae* sowie Hpr, HprK/P und CcpA aus *C. acetobutylicum* in *E. coli* überexprimiert. Alle genannten Proteine weisen am N- bzw. C-Terminus einen 6x-Histidinrest auf, der später einer affinitätschromatographischen Reinigung über Ni-NTA Agarose (s. 2.12.3) dienen sollte.

3.4.6.1 Heterologe Überexpression von Rgg3 aus *Streptococcus agalactiae* in *E. coli*

Das Protein Rgg3 aus *Streptococcus agalactiae* zeigt nach Sequenzvergleichen Homologie zu Regulatoren der Rgg-Familie. Aus *Streptococcus pyogenes* ist bekannt, dass das hier identifizierte Rgg-Protein die Funktion eines Virulenzregulators aufweist. So wird auch für Rgg3 die Eigenschaft eines putativen Transkriptionsregulators für verschiedene Virulenzgene in *Streptococcus agalactiae* vermutet. Beate Schaller versuchte im Rahmen ihrer Doktorarbeit, diese Funktion von Rgg3 nachzuweisen [Schaller, 2007].

Dafür war es notwendig, das Rgg3-Protein in ausreichender Menge und Reinheit für anschließende Untersuchungen zu erhalten. Das für Rgg3 kodierende Gen aus *Streptococcus agalactiae* war über die Schnittstellen *Nco*I und *Xho*I in den Überexpressionsvektor pET-28a(+) kloniert und somit unter die Kontrolle eines T7-Promoters gestellt worden. Über eine Fusion mit einer für 6 Histidine kodierenden AS-Sequenz am C-Terminus, die für eine spätere Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose dienen sollte, blieb die für die Transkriptionsregulation wichtige N-terminale Domäne erhalten. Das erhaltene Plasmid wurde pET28a_Rgg3 genannt. Während ihrer Doktorarbeit etablierte Beate Schaller ein Protokoll zur Überexpression dieses Proteins in *E. coli* ER2566, wobei Schwierigkeiten in der Überexpression dieses Proteins aufgrund der Bildung von sog. „inclusion bodies“ (Einschlusskörperchen) mit einer speziellen Durchführung der Wachstumsversuche überwunden werden konnten [Schaller, 2007]. Nach einer 3stündigen Inkubation bei 28 °C konnte die Genexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert werden. Nach weiteren 12-18 h Inkubation bei 18 °C erfolgte die Zellernte. Es wurde vermutet, dass auf diese Weise die Transkriptionsrate so gering gehalten werden kann, dass sich zumindest ein Teil des Proteins nicht in Folge einer zu großen Anhäufung als „inclusion bodies“ zusammenlagert und somit für nachfolgende Versuche gewonnen werden konnte. Das Protein sollte in

denaturierenden Gelelektrophoresen mit anschließenden „Western blot“-Experimenten als Positivkontrolle für diese Art der Wachstumsversuche dienen.

Die Überexpression erfolgte wie beschrieben im Maßstab von 250-500 ml TB-Medium (s. 2.12.1.3). Nach der Zellernte wurde ein kleiner Teil des Zellsediments mit 1 x Protein-Ladepuffer versetzt und auf das denaturierende Polyacrylamid-Gel aufgetragen (s. 2.12.6). Analog zu 2.12.9 und 2.12.10 erfolgte das „Western blot“-Experiment. Die aus Sequenzdaten mit Hilfe eines im Internet verfügbaren Programms (**Sequence manipulation Suite:** http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) errechnete Proteinmasse von Rgg3 (inkl. des fusionierten 6x-Histidinrests) betrug ca. 26 kDa. In folgender Abbildung 30 ist der immunologische Nachweis von Rgg3 mit spezifischen Antikörpern gegen den C-terminalen Histidinrest in Form eines „Western blot“-Experiments (s. 2.12.9, 2.12.10) dargestellt.

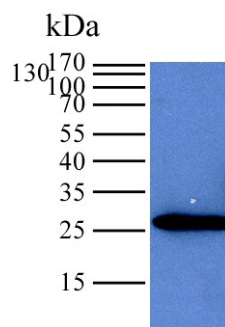


Abbildung 30: Immunologischer Nachweis von Rgg3 im „Western blot“-Experiment über spezifische Antikörper gegen den Histidinrest. Der auf dem Gel aufgetragene Protein-Größenmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“) ist neben Spur 1 schematisch dargestellt. Die Bande bei ca. 26 kDa repräsentiert Rgg3.

Das Protein Rgg3 aus *Streptococcus agalactiae* ließ sich ohne Probleme überproduzieren und mit erwarteter Größe von ca. 26 kDa im „Western blot“-Experiment nachweisen.

3.4.6.2 Heterologe Überexpression von Hpr, HprK/P und CcpA aus *C. acetobutylicum* in *E. coli*

Im Gegensatz zu Gram-negativen Organismen ist in Gram-positiven Bakterien die Katabolitrepession an das sog. Histidin-enthaltende Protein (HPr-Protein) des Phosphotransferasesystems (PTS) gekoppelt. Dieses Protein wird im Kontext des PTS durch das Enzym I am His-15 phosphoryliert, kann aber auch unabhängig davon durch eine ATP-abhängige Kinase (HprK/P) am Ser-46 phosphoryliert werden. HPr-Ser-46 kann nun die Bindung von CcpA („catabolite controlling protein A“) an die DNA-Erkennungssequenz induzieren [Deutscher et al., 1995; Jones et al., 1997]. Der Hpr-CcpA-Komplex kann sog. *cre*-Motive auf der DNA erkennen und daran binden [Fujita et al., 1995]. So wird die transkriptionelle Aktivierung bzw. Reprimierung der respektiven Gene vermittelt.

Aus anderen Arbeiten (Niklas Nold, persönliche Mitteilung) war bekannt, dass HprK/P, wie auch die in dieser Arbeit untersuchten Kinasen, ein Protein ist, das aufgrund von Toxizität für den Überexpressionsstamm Schwierigkeiten bei der Überproduktion bzw. der anschließenden Aufreinigung bereitet. Somit war eine mit den hier untersuchten Kinasen vergleichbare Situation gegeben. Eine Positivkontrolle für eine Phosphorylierung *in vitro* in den anstehenden Phosphorylierungsversuchen sollte die Phosphorylierungsreaktion von Hpr durch HprK/P sein. Dafür musste demnach zusätzlich zu HprK/P auch Hpr überproduziert werden. Das CcpA-Protein wurde als weitere Positivkontrolle in Überexpressionen von Proteinen, denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen mit anschließender Silber-Färbung und „Western blot“-Experimenten benötigt.

Das Plasmid pQE_hprK (Gen *hprK/P* mit N-terminaler 6xHis-Fusion im Vektor pQE-30, von Niklas Nold zur Verfügung gestellt) war hierfür bereits in den Überexpressionsstamm *E. coli* M15 (pREP4) transformiert worden (Niklas Nold, persönliche Mitteilung). Die Überproduktion des Proteins fand im 500-ml-Maßstab in TB-Medium statt. Die Expression des Gens *hprK/P* wurde mit 1 mM IPTG bei einer optischen Dichte der Kultur von 2,8 induziert (s. 2.12.1.3). Zu diesem Zeitpunkt sollten genügend Zellen vorhanden sein, die das HprK/P-Protein in für anschließende Nachweise ausreichender Menge produzieren können, bevor das Protein den Expressionsstamm aufgrund seiner Toxizität im Wachstum beeinträchtigt.

Die Plasmide pET29_hpr und pET29_ccpA waren zur Überexpression von Hpr und CcpA im Rahmen der Doktorarbeit von Niklas Nold bereits in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert worden. Durch die Klonierung der Gene *hpr* und *ccpA* aus *C. acetobutylicum* in den Vektor pET-29(a)+ kann im Gegensatz zu pET-28(a)+ nur eine

Fusion mit einer für 6 Histidine kodierenden AS-Sequenz am C-Terminus erreicht werden. Der verwendete Vektor entspricht aber ansonsten dem pET-28(a)+-Überexpressionsvektor. Beide Proteine wurden in jeweils 500 ml TB-Medium produziert, wobei die Induktion der Expression bei einer optischen Dichte der Kulturen von ca. 0,8 erfolgte (s. 2.12.1.3).

Nach der Zellernte wurden analog zu 2.12.2 von allen drei *E. coli*-Stämmen Rohextrakte hergestellt. Die Proteine HprK/P, Hpr und CcpA, deren errechnete Proteinmassen (aus Sequenzdaten und dem Programm (Sequence manipulation Suite: http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html;) der Tabelle 18 zu entnehmen sind, konnten anschließend über eine Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure aufgereinigt werden.

Tabelle 18: Proteinmassen der Proteine HprK/P, Hpr und CcpA inkl. des fusionierten 6x-Histidinrests.

Protein	Proteinmasse [kDa]
HprK/P	36,07
Hpr	10,1
CcpA	38,5

Der Nachweis der Proteine geschah in „Western blot“-Experimenten (s. 2.12.9, 2.12.10) nach denaturierender Gelelektrophorese (s. 2.12.6) und ist in Abbildung 31 dargestellt.

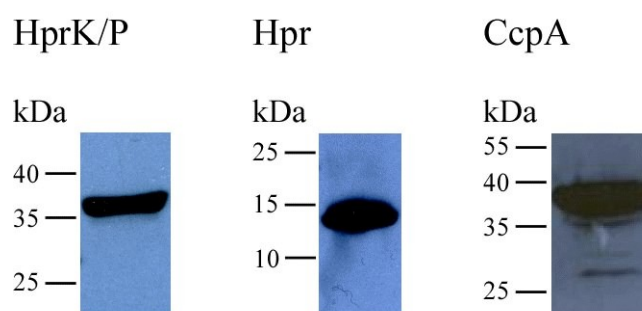


Abbildung 31: Immunologischer Nachweis der Proteine HprK/P, Hpr und CcpA in „Western blot“-Experimenten über spezifische Antikörper gegen Histidinreste. Der auf dem Gel aufgetragene Protein-Größenmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“) ist jeweils schematisch dargestellt.

Wie der Abb. 31 zu entnehmen ist, war für HprK/P ein Signal bei ca. 36 kDa zu erkennen. Bei dem immunologischen Nachweis von Hpr und CcpA ergaben sich Signale bei ca. 13 bzw. 38 kDa. Zusammen mit den experimentell bestimmten Proteinmassen war somit der Nachweis erbracht, dass die Proteine HprK/P, Hpr und CcpA ohne Schwierigkeiten überproduziert und nachgewiesen werden konnten. Die Proteine konnten nun als Positivkontrollen in Überexpressionen anderer in dieser Arbeit untersuchter Proteine, in denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen mit anschließender Silber-Färbung, in „Western blot“-Experimenten oder Phosphorylierungsversuchen eingesetzt werden.

3.5 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von CAC3156 aus *Clostridium acetobutylicum*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte neben *spo0A* der Transkriptionsstartpunkt eines weiteren Gens, CAC3156 aus *C. acetobutylicum* bestimmt werden.

Dieses Gen kodiert für ein YazC *B. subtilis* orthologes uncharakterisiertes Protein mit einer Größe von 426 Bp. Es ist im Genom von *C. acetobutylicum* ATCC 824 auf dem Gegenstrang von Base 3291487 bis 3291912 lokalisiert. Wie im Internet (<http://biocyc.org/CACE272562/NEW-IMAGE?type=GENE-IN-MAP&object=CAC3156>) beschrieben ist, bildet es zusammen mit drei weiteren Genen ein Operon mit einer Gesamtlänge von 3056 Bp. Folgende Abbildung 32 stellt das Operon und die 5'- bzw. 3'- flankierenden Gene dar.

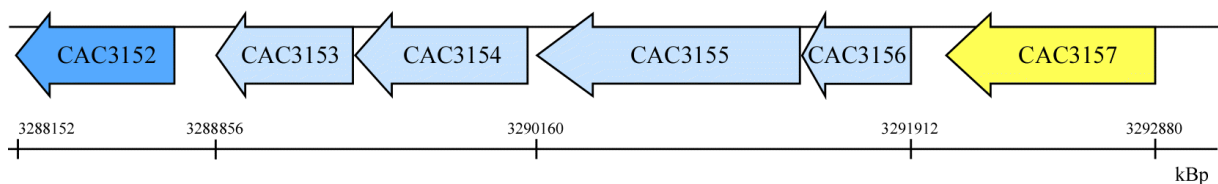


Abbildung 32: Schematische Darstellung der offenen Leserahmen in der Region um das Gen CAC3156 von *C. acetobutylicum*. Innerhalb des die DNA repräsentierenden Balkens ist die Lage und die Transkriptionsrichtung der offenen Leserahmen angegeben, die Zuordnung zur Lage im Genom ist durch Angabe der Basen oberhalb des Balkens möglich. Die offenen Leserahmen sind wie folgt annotiert: CAC3152: „DNA-dependent RNA polymerase sigma subunit“, CAC3153: „uncharacterized conserved protein, YacP *B. subtilis* ortholog“, CAC3154: „rRNA methylase, YacO *B. subtilis* ortholog“, CAC3155: „uncharacterized conserved protein, THY1 family“, CAC3156: „uncharacterized conserved protein, YazC *B. subtilis* ortholog“, CAC3157: „tryptophan synthase alpha chain“ [Nölling et al., 2001].

Stromabwärts auf dem gleichen Strang liegt das 1320 Bp große Gen CAC3155, das für ein uncharakterisiertes konserviertes Protein aus der THY1-Familie kodiert. Weiter stromabwärts liegen die Gene CAC3154 und CAC3153, die eine Größe von 759 Bp bzw. 519 Bp aufweisen und für eine YacO *B. subtilis* orthologe rRNA Methylase bzw. ein YacP *B. subtilis* orthologes uncharakterisiertes konserviertes Protein kodieren. 66 Bp von dem Stoppkodon von CAC3153 ist das Startkodon des 639 Bp großen Gens CAC3152 lokalisiert. Dieses Gen kodiert für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase Sigma-Untereinheit und zeigte in vorangegangenen Sequenzvergleichen eine 61%ige Identität und 76%ige Ähnlichkeit zu der *sigH*-Sequenz von *B. subtilis* [Hollergschwandner, 2003]. 177 Bp von dem Startkodon von CAC3156 liegt das Stoppkodon des Gens CAC3157, das für eine Tryptophan-Synthase α -Kette kodiert und 792 Bp umfasst.

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von CAC3156 wurden PEX- und Sequenzierreaktionen analog zu (s. 2.8.6, 2.10.1.2) mit radioaktiver Markierung durchgeführt. Die RNA für die PEX-Versuche wurde aus Kulturproben isoliert (s. 2.4.3), die zu bestimmten Zeitpunkten während des Wachstums von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur (vgl. Abb. 10, 11) abgenommen worden waren. Für die Sequenzierreaktionen wurde das Plasmid pDRIVE_3156 verwendet, welches das Gen CAC3156 und den dazugehörigen Promoterbereich als 1114 Bp großes Fragment trägt. Hierfür wurde der angegebene Bereich mit den „primer“ 3156-PCRfw und 3156-PCRrev (Nr. 18 und 19 aus Tab. 3) amplifiziert (s. 2.8.1). Anschließend konnte das PCR-Produkt direkt über eine TA-Klonierung in den Vektor pDRIVE® kloniert werden (s. 2.7.4). In Abbildung 33 ist das für die Sequenzierreaktionen gebrauchsfertige Plasmid pDRIVE_3156 gezeigt.

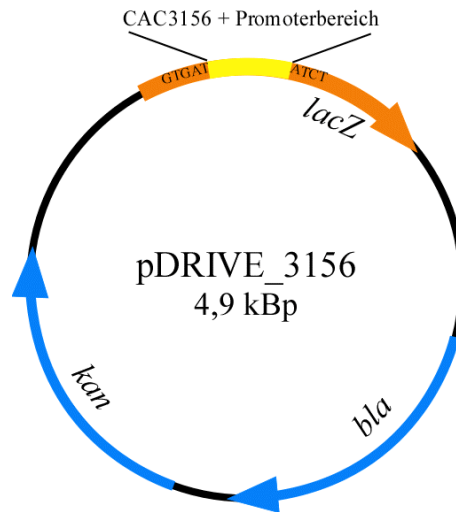
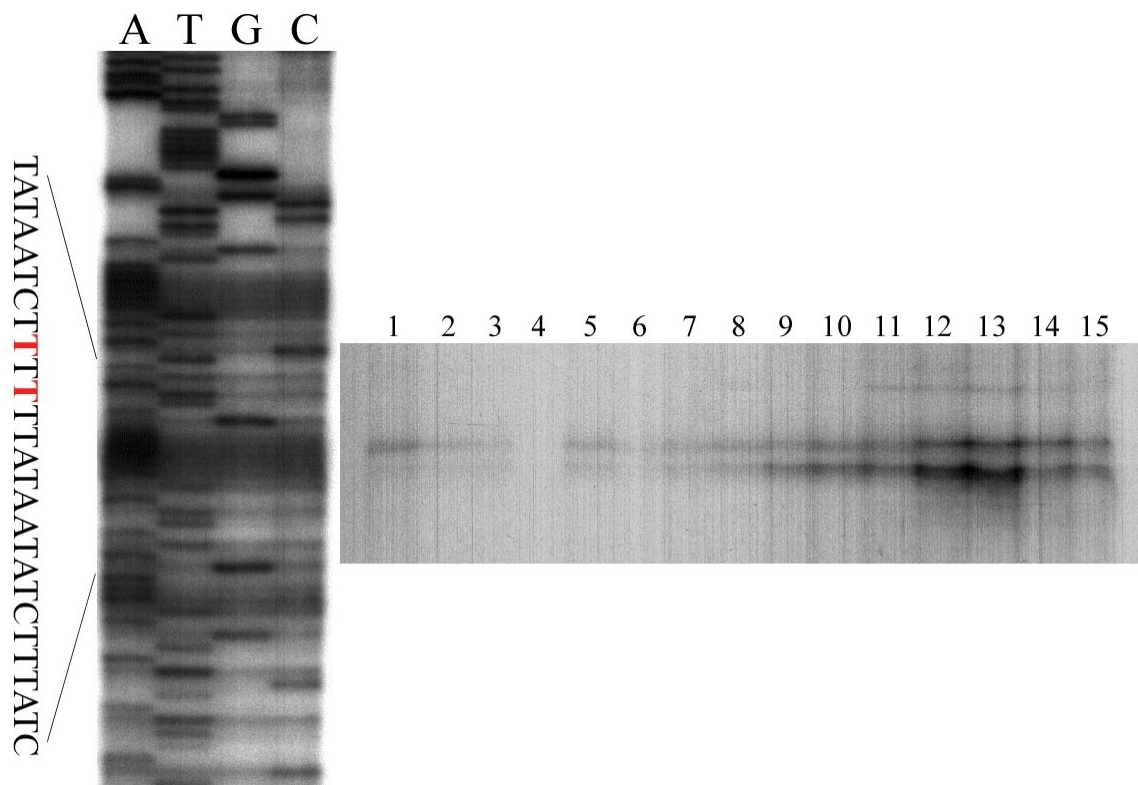


Abbildung 33: Plasmid pDRIVE_3156. Das Gen für die Ampicillinresistenz (*bla*) und das Kanamycin-Resistenzgen (*kan*) sind als blaue Pfeile gekennzeichnet. Das für eine Blau-Weiß-Selektion notwendige *lacZ*-Gen ist als orange-farbener Pfeil angezeigt. Zwischen die Basen -GTGAT und ATCT- wurde das Gen CAC3156 und die dazugehörige Promoterregion (als gelbes Fragment eingezeichnet) über TA-Klonierung direkt in den Vektor kloniert.

Wie die „primer extension“-Reaktionen (s. 2.10.1.2) wurden auch die Sequenzierreaktionen mit den Oligonukleotiden P3156-start und cDNA3156-fw3 (Nr. 17 und 20 aus Tab. 3) hergestellt. In Abbildung 34 ist das Ergebnisse der Sequenzier- und PEX-Analysen unter Verwendung des „primer“ P3156-start beispielhaft dargestellt.

Abbildung 34 (nächste Seite): Bestimmung der 5'-Enden von mRNA Fragmenten des Gens CAC3156 aus *Clostridium acetobutylicum* mit Hilfe von „primer extension“-Experimenten mit radioaktiver Markierung. Neben den ebenfalls mit dem Oligonukleotid P3156-start hergestellten Sequenzierreaktionen (A T G C) sind die „primer extension“-Reaktionen aufgetragen, die mit Gesamt-RNA aus einem Wachstumsversuch von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur (vgl. Abb. 10, 11) durchgeführt worden waren. Die RNA wurde hierfür zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums isoliert. Spur 1: Zeitpunkt 0 direkt nach Abschalten der pH-Kontrolle; Spur 2: 1 h nach Abschalten; Spur 3: 2 h; Spur 4: 3 h; Spur 5: 4 h; Spur 6: 5 h; Spur 7: 6 h; Spur 8: 7,75 h; Spur 9: 9,25 h; Spur 10: 10,75 h; Spur 11: 13,5 h; Spur 12: 30,25 h; Spur 13: 36 h; Spur 14: 54 h; Spur 15: 78 h. Links neben dem Bild ist der relevante Sequenzbereich zur Verdeutlichung schematisch dargestellt. rot: die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Startpunkte. Dieses Ergebnis steht stellvertretend für die Ergebnisse aus mehreren voneinander unabhängigen Versuchen, die mit P3156-start bzw. cDNA3156-fw3 und isolierter RNA aus zwei verschiedenen kontinuierlichen Wachstumsversuchen mit *C. acetobutylicum* durchgeführt worden waren.



Die beiden erkennbaren Signale sind 72 bzw. 74 Bp vor dem Startkodon von CAC3156 lokalisiert, wobei das stärkere Signal 72 Bp vor dem ATG für weitere Analysen verwendet wurde. Die Transkription von CAC3156 von diesem Startpunkt aus begann laut Abbildung 34 bereits in der logarithmischen Phase nach ca. 3-4 h nach Abschalten der pH-Kontrolle und hielt bis zum Ende des Wachstums an. Von Beginn an ist eine deutliche Zunahme der Signalintensität bis ungefähr 36 h nach Abschalten der pH-Kontrolle zu beobachten. 36 h nach Abschalten der pH-Kontrolle (Spur 13), d. h. in der stationären Phase, ist das Signal am stärksten, verliert aber bis zum Ende des Wachstums hin wieder an Intensität. Da dieses Signal mit verschiedenen Oligonukleotiden reproduzierbar auftrat, kann es als Transkriptionsstartpunkt von CAC3156 angenommen werden.

4 Diskussion

4.1 Einführung zur Sporulation in verschiedenen Organismen

Zelldifferenzierung ist als eines der Kennzeichen lebender Systeme ein fundamentaler biologischer Prozess. Er ist oft Teil eines zellulären Lebenszyklus, in dem Zellen spezialisierte Strukturen ausbilden, die an der sexuellen Reproduktion, der Verbreitung oder dem Überleben beteiligt sind. Bei Eukaryoten sind die Hyphen-, Sporen- und Fruchtkörperbildung bei verschiedenen Pilzen und Schleimpilzen Beispiele für Zelldifferenzierungen. Daneben ist Zelldifferenzierung aber auch bei Prokaryoten verbreitet. Zu nennen wären hier beispielsweise die Cystenbildung von z. B. *Azotobacter*, die Heterocystenbildung von Cyanobakterien, die Bildung von Fruchtkörpern und Myxosporen bei Myxobakterien, die Synthese von oberirdischem Mycel (Luftfäden) und Conidien bei *Streptomyces*, gestielte und schwärmende Zellen von *Caulobacter*, die Produktion von Exosporen in *Methylosinus* und die Bildung von Endosporen in z. B. den Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* [zur Übersicht s. Brun und Shimkets, 2000; Madigan et al., 2000]. Sowohl Sporen als auch Cysten sollen das Überleben unter ungünstigen Umweltbedingungen sichern. Im Gegensatz zur Endosporenbildung ergibt eine asymmetrische Teilung bei *Methylosinus* eine Mutterzelle und eine außen an die Zelle angeheftete Exospore [Whittenbury et al., 1970]. Dahingegen wird bei Myxobakterien, Cyanobakterien und *Azotobacter* die ganze vegetative Zelle in eine Myxospore bzw. eine Cyste umgewandelt [Shimkets und Brun, 2000].

Obwohl zwischen endosporenbildenden Bakterien teilweise eine beträchtliche Heterogenität besteht (z. B. phototrophe Heliobakterien und aerobe Bacilli), sind sie alle „ökologisch“ verwandt, da sie in der Natur vornehmlich im Boden vorkommen. Da dieses Habitat im Hinblick auf Nährstoffangebot, Temperatur und Wasseraktivität eine äußerst variable Umwelt darstellt, kann die Fähigkeit zur Bildung von hitze-, strahlungs- und austrocknungsresistenter Endosporen ein erheblicher Vorteil für das Überleben sein. Unter entsprechend günstigen Bedingungen können diese Sporen innerhalb weniger Stunden wieder zu vegetativen Zellen auskeimen.

Die Sporulation stellt einerseits eine sehr effektive Überlebensstrategie dar, ist andererseits aber auch mit hohen Risiken verbunden. So kann die Zelle zwar langfristig überdauern, entzieht sich aber der Möglichkeit, sich der Konkurrenz zu widersetzen und wird aus Vermehrungs- und evolutionären Prozessen ausgeschlossen. Darum kommt die Sporenbildung in der Reaktion auf überlebensgefährdende Umweltbedingungen nur für Teile der Population oder als letzter Ausweg in Betracht. Es ist daher unerlässlich, möglichst viele

verschiedene Faktoren in die Entscheidung zur Sporulation zu integrieren und die Sporulation nur dann auszulösen, wenn sie erfolgreich beendet werden kann und es keinen anderen Ausweg gibt.

Lange Zeit hatte man aufgrund von morphologischen Untersuchungen angenommen, dass die Mechanismen zur Endosporenbildung in den Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* identisch sein müssen [Woods und Jones, 1986]. Allerdings zeigte sich, dass im Gegensatz zu *B. subtilis*, in welchem die Sporulation in statischer Kultur durch Stickstoff- und Kohlenstoffmangel ausgelöst wird, die Sporulation von *C. acetobutylicum* und anderen saccharolytischen Clostridien auch bei einem Überfluss an Stickstoff und Kohlenstoff erfolgt [Fond et al., 1984; Gottschal und Morris, 1981; Long et al., 1984b]. Neben weiteren bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit erwähnten Unterschieden korrelieren bei *C. acetobutylicum* außerdem die sporulationsauslösenden Signale stark mit der Initiation der Lösungsmittelbildung, wobei vor allem das Vorhandensein von Butyrat im Medium und das damit verbundene Sinken des externen pH-Wertes als auslösende Faktoren angesehen werden. Hierzu ist allerdings zu sagen, dass die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge der Regulation des Fermentationsstoffwechsels in *C. acetobutylicum* noch nicht endgültig aufgeklärt sind. Die Genexpression in sporenbildenden Gram-positiven Bakterien wird vor allem durch Regulation auf transkriptioneller Ebene kontrolliert, wobei die Aktivierung spezieller sporulationsspezifischer Promotoren durch verschiedene Sigma-Faktoren von zentraler Bedeutung ist. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird das vegetative Wachstum und die Sporulation bei *B. subtilis* von RNA-Polymerase-Sigma-Faktoren gesteuert. Hierbei ist σ^A der wichtigste vegetative Sigma-Faktor. Die Sigma-Faktoren σ^H , σ^F , σ^E , σ^G und σ^K spielen während der Sporulation eine entscheidende Rolle und unterliegen einer strengen räumlichen und zeitlichen Kontrolle [Burkholder und Grossman, 2000; Hilbert und Piggot, 2004; Losick und Stragier, 1992; Piggot und Losick, 2002]. Auch in Clostridien wurden bei Genomanalysen zu *B. subtilis* homologe σ^A -, σ^H -, σ^F -, σ^E -, σ^G - und σ^K -Faktoren gefunden [Brüggemann et al., 2003; Nölling et al., 2001; Santangelo et al., 1998; Sauer et al., 1994; Sauer et al., 1995; Sebahia et al., 2006; Sebahia et al., 2007; Shimizu et al., 2002]. So scheint es trotz unterschiedlicher Signale für die Initiation der Sporulation ähnliche Mechanismen zur Bildung einer Endospore in den beiden Gattungen zu geben.

4.2 Das Spo0A-Protein – Bindeglied zwischen Lösungsmittelbildung und Sporulation

Das *spo0A*-Gen wurde sowohl in *Bacillus* als auch in *Clostridium* beschrieben [Brown et al., 1994]. Bereits im Jahr 1990 postulierten Woolley und Morris die Beteiligung eines globalen Regulators an den drei Ereignissen der stationären Phase, der Lösungsmittelbildung, der Sporulation und der Speicherung von Granulose in *C. beijerinckii* [Woolley und Morris, 1990]. In nur einem Schritt war eine in allen drei Eigenschaften defekte Mutante zu einem Stamm revertiert, der Sporulation, Lösungsmittelbildung und Speicherung von Granulose vergleichbar mit einem Wildtyp-Stamm zeigte. Wilkinson et al. diskutierten im Jahr 1995 Spo0A als Regulator der Lösungsmittelbildung und Sporulation in *C. beijerinckii* [Wilkinson et al., 1995]. Studien von Ravagnani et al. (2000) belegen diese Vermutung [Ravagnani et al., 2000]. 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. In *C. acetobutylicum* hat eine Deletion von *spo0A* bzw. eine Mutation innerhalb des Gens die Folge, dass der Stamm nicht mehr sporulieren kann und keine für die Sporulation typisch geformten Zellen mehr bildet. Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von *spo0A* zu einer erhöhten und schneller ablaufenden Sporulation [Harris et al., 2002]. Auch konnten Gelretardationsexperimente mit dem gereinigten phosphorylierten Spo0A-Protein aus *C. acetobutylicum* zeigen, dass es definitiv an der Regulation der für die Lösungsmittelbildung notwendigen Operone *sol* und *adc* beteiligt ist [Hollerschwandner, 2003].

Spo0A stellt somit als globaler Regulator und Transkriptionsfaktor das lange postulierte Bindeglied zwischen der Lösungsmittelbildung und Sporulation in Clostridien dar. Allerdings weisen Reporterstudien von Konstrukten mit inaktivierten 0A-Boxen [Ravagnani et al., 2000], Reporterstudien zur Expression des *adc*-Operons nach Deletion der stromaufwärts liegenden 0A-Boxen [Böhringer, 2002], Inaktivierungsexperimente von *spo0A* [Harris et al., 2002], Reporterstudien zur Expression des *sol*-Operons nach Mutation und/oder Deletion der stromaufwärts liegenden 0A-Box [Feustel, 2004; Thormann et al., 2002] und Gelretardationsexperimente mit gereinigtem phosphorylierten Spo0A-Protein [Hollerschwandner, 2003] auf eine Beteiligung mehrerer zusätzlicher Transkriptionsregulatoren bei der Regulation der Lösungsmittelbildung in Clostridien hin.

Vergleichbar dazu gilt in *B. subtilis* Spo0A nicht nur als globaler Regulator der Sporulation, sondern reguliert zudem direkt oder indirekt die Synthese von extrazellulären Hydrolasen und Antibiotika, die Kompetenz und die Beweglichkeit [Hoch, 1993; Marahiel et al., 1993; Strauch und Hoch, 1993].

4.2.1 Der Transkriptionsstart von *spo0A* in *C. acetobutylicum*

Ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung zur Transkription von *spo0A* in *C. acetobutylicum*. Sollte die Transkription von *spo0A* in *C. acetobutylicum* nach einem ähnlichen Mechanismus verlaufen, wie es in *B. subtilis* der Fall ist, so müsste das *spo0A*-Gen zwei verschiedene Promotoren haben, die unterschiedlich reguliert werden. In *B. subtilis* ist ein schwacher Promoter P_v während des vegetativen Wachstums aktiv. Während des Anfangsstadiums der Sporulation, also am Beginn der stationären Phase, wird dieser reprimiert und der starke, sporulationsspezifische Promoter P_s wird aktiviert. Hierbei wird der vegetative Promoter von einer σ^A -abhängigen RNA-Polymerase erkannt. Der Bereich des Promoters P_s hingegen zeigt Ähnlichkeit zu einer Konsensus-Sequenz, die von dem Sigma-Faktor σ^H erkannt wird [Chibazakura et al., 1991; Predich et al., 1992]. In der Regulation der *spo0A*-Transkription ist dabei neben z. B. Spo0B, Spo0E und Spo0F, die das Promoter-„switching“ indirekt über die Produktion von Spo0A~P regulieren [Chibazakura et al., 1995], auch Spo0A selbst involviert. Das Spo0A-Protein fungiert hierbei als Regulator, indem es in phosphorylierter Form an OA-Boxen zwischen den Promotoren bindet und so gleichzeitig P_v reprimieren und P_s induzieren soll [Strauch et al., 1992]. Zudem ist der Sigma-Faktor σ^H , kodiert von *spo0H*, essentiell für die Transkription von *spo0A*, ausgehend von dem Promoter P_s [Chibazakura et al., 1995].

In *Bacillus subtilis* wurde der erste, also σ^A -abhängige Transkriptionsstartpunkt von *spo0A* mittels Nuklease-S1-Analyse 198 Bp [Chibazakura et al., 1991] bzw. mit Hilfe von „primer extension“-Experimenten 204 Bp [Predich et al., 1992] vor dem Translationsstartpunkt von Spo0A lokalisiert. Der zweite, σ^H -abhängige Transkriptionsstartpunkt wurde von Chibazakura et al. im Jahr 1991 50 Bp vor dem Translationsstartpunkt von Spo0A detektiert. Um wenige Nukleotide stromabwärts zum Translationsstartpunkt hin verschoben, konnten Predich und seine Mitarbeiter im Jahr 1992 den Transkriptionsstartpunkt von *spo0A* von dem sporulationsspezifischen Promoter P_s aus lokalisieren.

In *C. acetobutylicum* scheint dieser Mechanismus der Transkription von *spo0A* von zwei verschiedenen Promotoren aus ebenfalls zu existieren. „primer extension“-Experimente aus einer vorangegangenen Arbeit von C. Hollergschwandner [Hollergschwandner, 2003] und

„primer extension“-Experimente (3.1.2) und Versuche mit der Methode der 5'-RACE (3.1.3) aus der vorliegenden Arbeit bestätigen, abhängig von der Wachstumsphase, zwei verschiedene Transkriptionsstartpunkte von *spo0A*. In der vegetativen Phase wird *spo0A* von einem 164 Bp vor dem Translationsstartpunkt gelegenen Transkriptionsstartpunkt S1 aus abgelesen. Die Sequenzen der abgeleiteten -10- und -35-Regionen lassen sich mit einer 75%igen Identität als die eines σ^A -abhängigen Promoters identifizieren. Von diesem Startpunkt aus wird *spo0A* bis zum Übergang in die stationäre Phase abgelesen. In der stationären Phase erfolgt die Transkription von *spo0A* zusätzlich von einem zweiten Startpunkt S3 aus. Die Sequenzen der abgeleiteten -10- und -35-Regionen entsprechen jetzt denen eines σ^H -abhängigen Promoters mit 87%iger Homologie. Hier ist anzumerken, dass die „primer extension“-Signale sehr schwach waren und außerdem die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Abweichungen zu der Transkriptionsregulation von *spo0A* in *B. subtilis* auftreten.

In den *spo0A*-Transkriptionsstartpunktbestimmungen von *B. subtilis* wird die Aktivierung des zweiten, σ^H -abhängigen Promoters gleich am Beginn der stationären Phase [Predich et al., 1992] bzw. eine Stunde nach Eintritt in die stationäre Phase [Chibazakura et al., 1991] beschrieben. Die Ergebnisse aus Abb. 12 (3.1.2) der vorliegenden Arbeit können diesen zeitlichen Zusammenhang nicht bestätigen. Der genaue Zeitpunkt des Zuschaltens des zweiten Promoters ist aus Abb. 12 nicht ersichtlich, da zwischen den beiden Zeitpunkten von 13,5 h und 30,25 h nach Abschalten der pH-Kontrolle keine Probennahme erfolgt war. *spo0A* könnte demnach auch schon zu einem früheren Zeitpunkt von dem zweiten Promoter aus transkribiert worden sein. In der gezeigten *C. acetobutylicum*-Kultur hätte aber frühestens 14 h nach Abschalten der pH-Kontrolle, also 6 h nach Eintritt in die stationäre Phase ein zweiter Startpunkt detektiert werden können.

Ein Promoter-„switching“, wie es aus *B. subtilis* bekannt ist, kann mit vorliegenden Ergebnissen und auch mit den bereits von C. Hollergschwandner erhaltenen Daten nicht beobachtet werden. Der erste, σ^A -abhängige Promoter wird bei *B. subtilis* am Beginn der stationären Phase reprimiert und bis zum Ende des Wachstums ist nur noch der sporulationsspezifische Promoter aktiv [Chibazakura et al., 1991; Chibazakura et al., 1995; Predich et al., 1992]. In *C. acetobutylicum* scheint der zweite, σ^H -abhängige Promoter den vegetativen Promoter in der stationären Phase lediglich zu „unterstützen“, um eine für die Sporulation nötige Menge an Regulatorprotein zu gewährleisten. Hierbei waren die Signale, die den vegetativen Startpunkt S1 anzeigten, stets von stärkerer Intensität als diejenigen für den sporulationsspezifischen Startpunkt S3. Dieses Phänomen ist auch in den Ergebnissen von C. Hollergschwandner zu beobachten. Dieser Regulationsmechanismus könnte dem

Organismus erlauben, die Transkriptmenge von *spo0A* kurzzeitig über einen bestimmten kritischen Schwellenwert anzuheben und als Antwort auf bestimmte innere und äußere Reize die Sporulation zum richtigen Zeitpunkt einzuleiten.

Die Existenz eines sporulationsspezifischen, σ^H -abhängigen Promoters im Promoterbereich von *spo0A* in *C. acetobutylicum* und somit auch die Ähnlichkeit in der Regulation der Transkription von *spo0A* im Vergleich zu *B. subtilis* ist sehr wahrscheinlich. Die Besonderheit der Überlappung der abgeleiteten -10-Region mit der putativen 0A-Box, die in *B. subtilis* zu finden ist, ist auch in *C. acetobutylicum* vorhanden. Zusätzlich konnten mit Hilfe von Sequenzvergleichen von *C. acetobutylicum*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* und *C. sporogenes* aus einer vorangegangenen Arbeit von C. Schwarz [Schwarz, 2005] in den untersuchten *spo0A*-Genbereichen ebenfalls jeweils hoch konservierte -10- und -35-Promoterregionen abgeleitet werden, die sich eindeutig als die eines σ^H -abhängigen Promoters bestimmen ließen. Auch ließ sich eine Übereinstimmung des sich mit der -10-Region überschneidenden und in allen verglichenen Sequenzen vorkommenden Bindemotivs der 0A-Box von 100 % angeben. Eine Darstellung der festgestellten Gemeinsamkeiten in den Promotersequenzen dieser Clostridien findet sich in Abbildung 35. Um das Bild zu vervollständigen, wurden zusätzlich *spo0A*-Promoterbereiche der bis jetzt sequenzierten Clostridien *C. difficile*, *C. thermocellum*, *C. beijerinckii*, *C. kluyveri*, *C. novyi* und *C. phytofermentans* in den Vergleich aufgenommen.

Abbildung 35 (nächste Seite): Sequenzvergleiche eines Teils des Promoterbereichs von *spo0A* bei verschiedenen Clostridien. Dargestellt ist jeweils ein Teil des Genbereichs stromaufwärts des mit einem schwarzen Kasten markierten *spo0A*-Startkodons ATG bzw. GTG. In der angegebenen Konsensus-Sequenz sind die abgeleiteten -10- und -35-Regionen eines σ^H -abhängigen Promoters markiert. Die 0A-Box bezeichnet einen Sequenzbereich, der das abgeleitete Bindemotiv für das Spo0A-Protein darstellt und ist rot eingekreist. Der blau markierte Transkriptionsstartpunkt in der Sequenz von *C. acetobutylicum* entspricht dem mit „primer extension“-Experimenten und radioaktiver Markierung erhaltenen S3 (vgl. Abb. 9). Zum Vergleich ist der von C. Schwarz ermittelte Startpunkt S1 von *C. sporogenes* ebenfalls eingezeichnet [Schwarz, 2005]. Eine 100%ige Übereinstimmung der Basensequenz in allen untersuchten Clostridien ist dunkelgrau unterlegt, ab einer Übereinstimmung von 50 % sind die Basen hellgrau markiert. Verwendete Stämme: *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. thermocellum* ATCC 27405, *C. beijerinckii* NCIMB8052, *C. difficile* 630, *C. perfringens* ATCC 13124, *C. kluyveri* DSM 555, *C. botulinum* A str. ATCC 19397, *C. sporogenes* NCIMB10696, *C. phytofermentans* ISDg, *C. novyi* NT und *C. tetani* E88. Der Vergleich wurde erstellt mit dem im Internet frei verfügbaren Programm „MultAlin“ (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>; Version 5.4.1.).

	1				50
<i>C. acetobutylicum</i>			TA	AAACTATACA	TATGTTATTA
<i>C. thermocellum</i>	..TAAATGAT	TATATAGTAT	TATAAATGTA	AAACAAGTTA	TATAAAGAGT
<i>C. beijerickii</i>	CTTACAATAA	TTGTAGAAG	TAATATATTG	TGTTATATTG	TACAATGATG
<i>C. difficile</i>		GT	GAGGCATTAA	AAAATTTTAT	TATTTTATCA
<i>C. perfringens</i>			TA	AATGAATTTT	TTAGTATTTA
<i>C. kluyveri</i>		TATC	ATTAAGATAA	ATATATAAAA	AATTTTTTTA
<i>C. botulinum</i>		TATC	TTACACTTTA	TTATTTTTTA	TATATTTTTT
<i>C. sporogenes</i>				TTA	TATATTTTTT
<i>C. phytofermentans</i>		ATATT	ATGTAAGGTA	GATAGTGTCA	TAAAAGGTAA
<i>C. novyi</i>		TTT	TAAAAAATTA	TCCTGGT TTT	AGTAAATTTT
<i>C. tetani</i>	...TTTTTAC	TATTTATAAA	TCCCTTTTAT	CCTAATAATG	TAAAAAATTT
Konsensus			a..tta	t.tta	tatatt.tt.

	51				100
<i>C. acetobutylicum</i>	TATATAGGAG	AAGGATAAAT	AATAGTTTTG	TCGAATATAA	AATAACAAA
<i>C. thermocellum</i>	AATTTCATTA	CCCAGTATAT	TGAAATTTTG	TCGAATAGAC	AATATAATAA
<i>C. beijerickii</i>	GAACATTTA	ATAAGATATG	GTTATAGGGG	TTAAATAATA	TATT.....
<i>C. difficile</i>	ATTATCTAGG	AGGAATATAA	TTTTGGAGTG	TCGAATATGC	TTTAGAGTAG
<i>C. perfringens</i>	TTTTTTTTAG	AAGGAAATAA	ATAAGTTTTG	TCGAATATAG	TTAAAGTAGA
<i>C. kluyveri</i>	TATAAAAAAG	AAGGAAATAA	AATTCCTGTG	TCGAATTTAT	
<i>C. botulinum</i>	CTCAAATAAG	GAGGAATTAA	ATTTCTTTTG	TCGAATAA..	
<i>C. sporogenes</i>	CTCAAATAAG	GAGGAATTGA	ATTTCTTTTG	TCGAATAAAT	
<i>C. phytofermentans</i>	GAAAAATATG	AAAGGAATTG	GGCCCCTTTC	ATTATAACAC	T.....
<i>C. novyi</i>	TGGAAAAATAG	AAGGATTTAT	CGTGGTTTTG	TCGAAATAGT	
<i>C. tetani</i>	CTTAAATAAA	AAGGATTTAA	CTTTGTTTTG	TCGAAATAGT	T.....
Konsensus	..taaaataag	aaggaaataa	.tt..tttTG	TcgAAta.a.	

-35-Region

OA-Box

-10-Region

	101				150
<i>C. acetobutylicum</i>	ATGAT.....	...AATTTAT	GGTAAAAATTT	CTATATT.TT	ATAAAGGGGA
<i>C. thermocellum</i>	TGGTATA...	...AATTAAC	TAGCAGTCTT	TTACAAAAAA	TTAAGGGGGA
<i>C. beijerickii</i>		...AAAATAC	AAACATAATA	AAAGAATGGA	CAAAAGGAGA
<i>C. difficile</i>	ATAATTAGGA	AGCAATTGTG	TAAAAAGTTT	AGTTTCTGT	AATAAGAAGA
<i>C. perfringens</i>	ATAAT.....	...TGTAATA	AAATGGATAT	ATAAAGT.TG	GTTAAGGAGA
<i>C. kluyveri</i>	T.....	...AATTTGT	TAACATATGG	GAATTTA.TT	AAAAAGGGGA
<i>C. botulinum</i>	T.....	...AATTTGT	TAAGATATGG	TAATTTTATC	AAAAAGGAGA
<i>C. sporogenes</i>		...AATTTGT	TAAGATATGG	TAATTTTATC	AAAAAGGAGA
<i>C. phytofermentans</i>		TCTCG	TATGATATCG	GAAGGAAAAG	AATATTAGGA
<i>C. novyi</i>		...AATTGT	TAAGAAATGG	AACAAAAAGA	ATAAGGGGGA
<i>C. tetani</i>		...AGTTGT	TAGGATATGG	AATAATTTTG	TG.....
Konsensus		...aattt.t	tAa.Atat.g	.aa.att.t.	aaaAagg.GA

	151	162
<i>C. acetobutylicum</i>	GTAAAAATG	..
<i>C. thermocellum</i>	GTCAATTTG	..
<i>C. beijerickii</i>	GAAAAAATAT	G.
<i>C. difficile</i>	TGTTTTTTAA	TG
<i>C. perfringens</i>	GAAAAGCATG	..
<i>C. kluyveri</i>	GTGGTAAATA	TG
<i>C. botulinum</i>	GTAAGTTTATA	TG
<i>C. sporogenes</i>	GTAAGTTTATA	TG
<i>C. phytofermentans</i>	GGTTTCGTAA	TG
<i>C. novyi</i>	TAAAAAATTTA	TG
<i>C. tetani</i>		..
Konsensus	g.....ta	tg

Wie der Abbildung 35 zu entnehmen ist, ist die beschriebene Anordnung von 0A-Box und abgeleiteten -10- und -35-Regionen eines σ^H -abhängigen Promoters in jedem untersuchten *spo0A*-Promoterbereich zu finden. Abweichungen dazu weisen nur die Promoterbereiche von *C. beijerinckii* und *C. phytofermentans* auf.

In anderen Bakterien mit einem *spo0A*-Homolog wie *C. pasteurianum* und *B. megaterium* konnten ebenfalls Konsensusbereiche für σ^H -abhängige -10- und -35-Regionen identifiziert werden [Moran, 1993]. Eine Konsensussequenz für eine -10-Region, die mit der 0A-Box überlappt, findet sich auch in diesen Fällen [Brown et al., 1994].

Der in dieser Arbeit untersuchte Promoterbereich von *spo0A* aus *C. acetobutylicum* weist also Strukturen auf, die sich mit einem hohen Grad an Konserviertheit auch in anderen Clostridienstämmen wieder finden. Die Ähnlichkeit hinsichtlich der Lage der 0A-Box zur putativen -10- und -35-Region im Bereich stromaufwärts des *spo0A*-Gens kann als Anhaltspunkt gesehen werden, dass es sich bei dem ermittelten, σ^H -abhängigen Transkriptionsstartpunkt S3 in *C. acetobutylicum* um einen innerhalb der Clostridien konservierten funktionellen Startpunkt handelt.

Ein zu *B. subtilis* vergleichbarer Regulationsmechanismus der Transkription von *spo0A* über zwei verschiedene Promotoren ist in *C. acetobutylicum* demnach in ähnlicher Weise zu finden, aber, wie bereits angedeutet, nicht vollständig und auch nicht auf alle Clostridien übertragbar. Beispielsweise wird aus einer vorangegangenen Arbeit von C. Schwarz [Schwarz, 2005], in der der Promoterbereich von *spo0A* in *C. sporogenes* untersucht wurde, klar, dass hierfür noch weitere Untersuchungen hinsichtlich der Genorganisation von *C. sporogenes* sowie deren Regulationsvorgänge innerhalb der Sporulation durch die beiden Polymerase-Sigma-Faktoren σ^A und σ^H nötig wären. Außerdem konnten in den durchgeführten „primer extension“-Experimenten keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein von zwei verschiedenen Transkriptionsstartpunkten von *spo0A* in *C. sporogenes* gefunden werden, was auf eine gleiche Regulationsform der Transkription von *spo0A* in *B. subtilis* [Stragier und Losick, 1996] bzw. auch *C. acetobutylicum* schließen ließe.

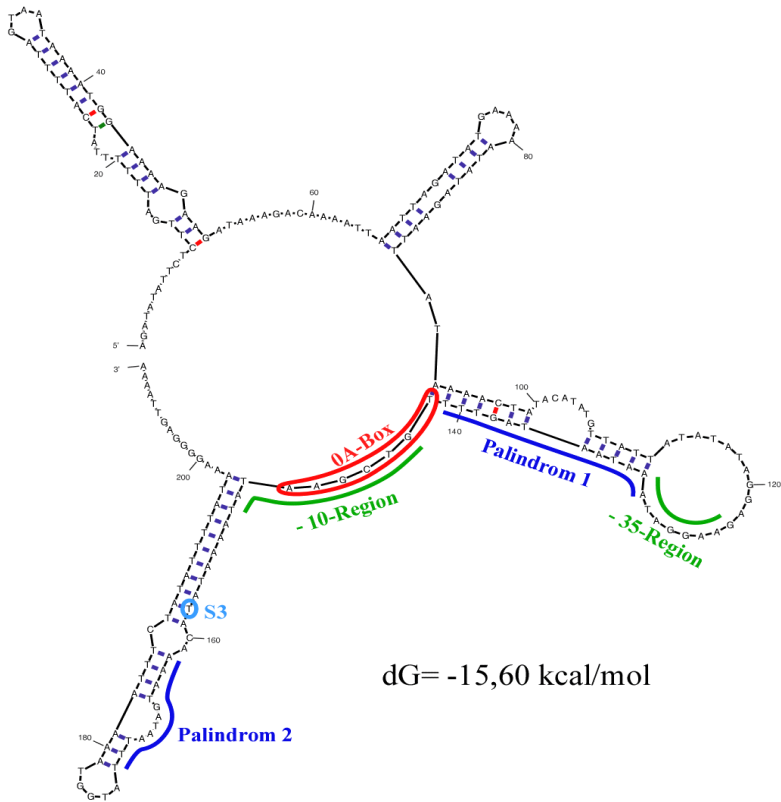
Inwieweit Prozessierung bei der Entstehung eines Transkripts von dem ebenfalls σ^A -abhängigen, in der vorliegenden Arbeit mit radioaktiven PEX- und Sequenzierreaktionen identifizierten Startpunkt S2 (vgl. Abb. 8, 12) aus eine Rolle spielt, bleibt im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen ungeklärt.

4.2.2 Regulation der *spo0A*-Transkription durch palindromische Sequenzen im Promoterbereich von *spo0A*

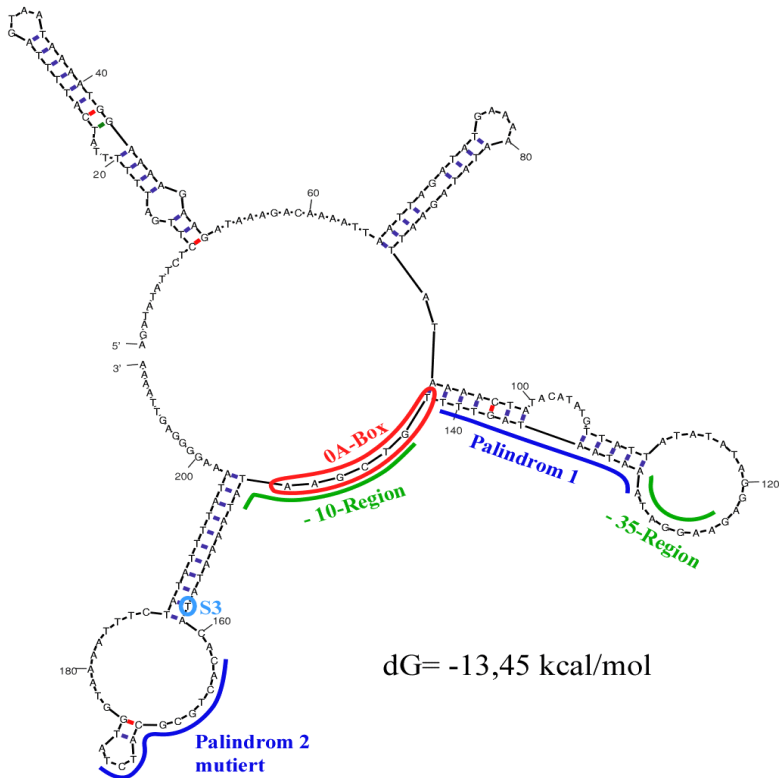
Im Promoterbereich von *spo0A* in *C. acetobutylicum* zeigen sich einige strukturelle Auffälligkeiten. Zwei palindromische Sequenzen könnten auf eine Beteiligung bei der Regulation der *spo0A*-Transkription hindeuten. Bereits in einer vorangegangenen Arbeit von C. Hollergschwandner [Hollergschwandner, 2003] war eine Beteiligung des Palindroms 1 stromaufwärts von der 0A-Box diskutiert worden. Im Wildtyp-Promoterfragment von *C. acetobutylicum* ergab eine DNA-Faltungsstudie von C. Hollergschwandner, dass eine durch zwei Palindrome ausgebildete Haarnadelstruktur möglicherweise zur exponierten Lage der mit der σ^H -Konsensus -10-Region überlappenden 0A-Box führt. Gleichzeitig befand sich die σ^H -Konsensus -35-Region in einer für die RNA-Polymerase schlecht zugänglichen Position. Deswegen wurde eine mögliche Strukturänderung der DNA durch die Bindung von Spo0A~P an die exponierte 0A-Box diskutiert, was dann zu einer „freien“, nun durch die RNA-Polymerase erkennbaren Lage der -10- und -35-Region führen könnte. Diese Struktur des Wildtyp *spo0A*-Promoterbereiches konnte allerdings mit einer erneuten Berechnung mit dem im Internet frei verfügbaren Programm „mfold“ (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>) nicht bestätigt werden. Die energetisch günstigste Faltungsstruktur des Wildtyp-*spo0A*-Promoterbereiches ist in Abbildung 36 A dargestellt und unterscheidet sich grundlegend von der aus der Arbeit von C. Hollergschwandner. Nach der Methode von Zuker [Zuker, 2003] wurde, wie in der vorangegangenen Arbeit auch, ein Bereich von 210 Bp stromaufwärts des *spo0A*-Startkodons durch Berechnung der energetisch günstigsten Möglichkeit für DNA gefaltet. Dabei zeigte sich, dass die beiden palindromischen Sequenzen nicht miteinander paaren und somit auch keine Haarnadelstruktur ausbilden. Die mit der σ^H -Konsensus -10-Region überlappende 0A-Box befindet sich in keiner exponierten Lage und die σ^H -abhängigen -10- und -35-Regionen sind leicht zugänglich. Gleiches gilt für die Struktur der im Palindrom 2 mutierten Promotersequenz von *spo0A* aus der vorliegenden Arbeit (vgl. Abb. 36 B).

Abbildung 36 (nächste Seite): Energetisch günstigste Faltungsstruktur eines 210 Bp großen Bereiches stromaufwärts des *spo0A*-Startkodons aus *C. acetobutylicum*. Die Strukturen wurden mit „Mfold“ (Version 3.2.) berechnet und graphisch dargestellt (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>). **A:** Energetisch günstigste Faltungsstruktur der Wildtyp-Promotersequenz von *spo0A*. **B:** Energetisch günstigste Faltungsstruktur der im Palindrom 2 mutierten Promotersequenz von *spo0A*. Die beiden palindromischen Sequenzbereiche Palindrom 1 und Palindrom 2 sind blau markiert, die putative 0A-Box ist durch eine rote Ellipse angezeigt. Die abgeleiteten -10- und -35-Regionen (grün) beziehen sich auf den ermittelten, σ^H -abhängigen Transkriptionsstartpunkt S3, der blau eingekreist ist.

A



B



Wie die von C. Hollergschwandner angegebene, energetisch günstigste Faltungsstruktur der Wildtyp-Promotersequenz von *spo0A* entstanden ist, kann nicht nachvollzogen werden, wobei die damals verwendete Programmversion unbekannt ist. Eventuell spielen dabei Veränderungen bzw. Verbesserungen von Parametern im verwendeten Berechnungsalgorithmus von „mfold“ eine Rolle. Dagegen spricht allerdings, dass die von C. Hollergschwandner angegebene Faltungsstruktur der im Palindrom 1 mutierten Promotersequenz von *spo0A* (ähnlich der Struktur mit Mutationen im Palindrom 2 aus der vorliegenden Arbeit) durch erneute Berechnung durchaus reproduzierbar war. Hier befindet sich die 0A-Box nicht in exponierter Lage und die σ^H -abhängigen -10- und -35-Regionen sind sehr leicht zugänglich. Im Vergleich zu der von C. Hollergschwandner angegebenen Wildtyp-Promotersequenz wurde von ihr geschlussfolgert, dass die erhaltene und erhöhte Genaktivität des im Palindrom 1 mutierten Konstruktes im Gegensatz zur Wildtyp-Promotersequenz im LucB-Reportergen-Versuch durch die veränderte Sekundärstruktur auf DNA-Ebene zustande gekommen sein könnte. Aber auch die von ihr erhaltenen Luciferaseaktivitäten aus den Reportergenstudien können nicht nachvollzogen werden. Falls es sich bei dem Fehler in der Sequenz des für die Klonierungen verwendeten „primer“ nicht um einen Tippfehler handelt, kann aufgrund des dadurch entstandenen Rasterschubs im *lucB*-Gen (vgl. 3.3) kein intaktes LucB entstanden sein. Dafür würden auch die von C. Hollergschwandner erhaltenen niedrigen RLU-Werte sprechen, die sich im Vergleich zu den Daten der vorliegenden Arbeit oder vorangegangenen Arbeiten von z. B. C. Schwarz [Schwarz, 2005] mehr oder weniger im Bereich um den Hintergrundwert (= Aktivität von Rohextrakt eines rekombinanten *C. acetobutylicum* mit dem pLucBF_neu ohne jeglichen Promoter vor dem *lucB*-Gen; ~ 80-100 RLU; Daten nicht gezeigt) bewegen.

Da sich, den neuen Berechnungen nach zufolge, die Sekundärstrukturen der Wildtyp-Promotersequenz von *spo0A* von der im Palindrom 2 mutierten Promotersequenz nur unmerklich unterscheidet und somit die Zugänglichkeit für die RNA-Polymerase gleich zu bleiben scheint, könnten die beiden palindromischen Sequenzen auch Erkennungssequenzen für ein Regulatorprotein darstellen. Eine tatsächlich erhöhte Genaktivität des im Palindrom 1 mutierten Konstruktes im *lucB*-Reportergenversuch könnte deshalb auf die Zerstörung einer Erkennungssequenz für ein Repressorprotein hindeuten. Daher wurde der Bereich um die beiden palindromischen Sequenzen im Promoterbereich von *spo0A* auf mögliche Erkennungssequenzen überprüft. Dafür wurde auch das im Internet frei verfügbare Programm „prodoric“ (http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp_promoter.php) verwendet. Tatsächlich ergaben die Untersuchungen, dass die beiden palindromischen Sequenzen jeweils mit Teilen potentieller Erkennungssequenzen für das Repressorprotein AbrB überlappen. Die Konsensussequenz der AbrB-Bindestelle aus *B. subtilis* ist in folgender Abbildung 37 in Form

eines Sequenzlogos dargestellt, das mit Hilfe des im Internet frei verfügbaren Programms „WebLogo“ (<http://weblogo.berkeley.edu>) erstellt wurde [Crooks et al., 2004; Schneider und Stephens, 1990].



Abbildung 37: Konsensussequenz der AbrB-Bindestelle aus *B. subtilis*. Dargestellt ist ein Sequenzlogo, das aus 13 verschiedenen *B. subtilis* AbrB-Bindestellen berechnet wurde. In dieser Darstellung entspricht die Höhe einer Spalte dem Informationsgehalt dieser Position (in bit). Dies entspricht dem positionsabhängigen Gewicht in einer entsprechenden Matrix. Die Höhe der einzelnen Buchstaben entspricht der Häufigkeit an dieser Position. Die Berechnung des Logos wurde im Internet mit dem Programm „WebLogo“ erstellt (<http://weblogo.berkeley.edu>).

In *C. acetobutylicum* überlappt mit dem Palindrom 1 die potentielle AbrB-Erkennungssequenz 5'-CAAACTA-3' mit den letzten 6 Basen, mit dem Palindrom 2 überlappt die Bindestellensequenz 5'-CATAAATT-3' mit den letzten 5 Basen. Zur Verdeutlichung sind in folgender Abbildung 38 die potentiellen Bindestellen von AbrB im Bezug auf die Lage der Palindrome im Promoterbereich von *spo0A* gezeigt.

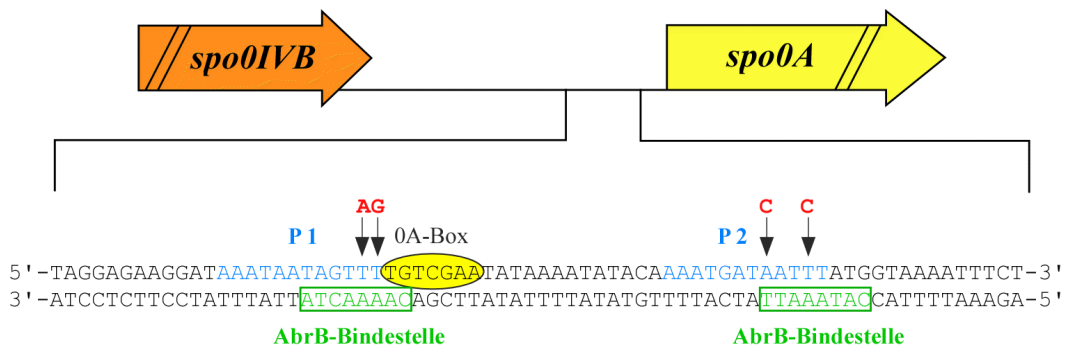


Abbildung 38: Lage der potentiellen AbrB-Bindestelle im Bezug auf die Lage der Palindrome P 1 und P 2 im intergenen Bereich zwischen *spoIVB* und *spo0A*. Dargestellt ist auszugsweise die Wildtyp-Promotersequenz von *spo0A*. Die Palindrome sind blau gekennzeichnet, die putative 0A-Box ist eingekreist. Die potentielle Erkennungssequenz von AbrB ist mit einem grünen Kasten angezeigt. Mit Pfeilen sind jeweils die Stellen im Palindrom gekennzeichnet, die von C. Hollergschwandner (P 1) bzw. in der vorliegenden Arbeit (P 2) mutiert wurden. Die roten Buchstaben zeigen dabei die verschiedenen Basenaustausche an.

Aus *B. subtilis* ist bekannt, dass bei der Initiation der Sporulation die Transkriptionsfaktoren Spo0A und AbrB eine Schlüsselrolle spielen [Brown et al., 1994; Phillips und Strauch, 2002]. AbrB ist ein negativer Regulator der Transkription, der an eine Reihe verschiedener Promotoren bindet und so ihre Expression verhindert [Strauch et al., 1989; Zuber und Losick, 1987]. Seine Hauptaufgabe ist dabei aber nicht unbedingt die Regulation der Transkription verschiedener Gene, sondern eher eine Verhinderung der Synthese von während des exponentiellen Wachstums nicht gebrauchten Proteinen. AbrB reguliert daneben auch eine Reihe von Genen, die für die Produktion von Antibiotika wie Subtilisin [Zheng et al., 1999] und TasA [Stover und Driks, 1999] verantwortlich sind.

In Zusammenspiel von AbrB und Spo0A~P kann die Zelle sehr sensibel und schon zu einem frühen Zeitpunkt des Wachstums auf Einflüsse der Umgebung, des Metabolismus oder anderer Zellsignale reagieren. In *B. subtilis* kann Spo0A dabei als Repressor oder als Aktivator agieren [Satola et al., 1991; Strauch et al., 1990]. Promotoren wie z. B. *abrB* werden direkt durch Spo0A reprimiert. Spo0A nimmt auch indirekt Einfluss auf die Expression verschiedener sporulationsspezifischer Gene. Das Gen für SigH, welches in *B. subtilis* durch das von Spo0A regulierte AbrB reprimiert wird, kann aufgrund der Repression von *abrB* durch Spo0A~P abgelesen werden. So ist Spo0A~P ein positiver Induktor seiner eigenen Synthese und kann neben der Reprimierung seines vegetativen σ^A -

Promoters auch die Induktion seines σ^H -abhängigen Sporulationspromoters [Strauch et al., 1992; Strauch et al., 1993] bewirken.

In *C. acetobutylicum* existieren drei zu AbrB aus *B. subtilis* homologe Gene (abrB0310, abrB1941, and abrB3647) [Nölling et al., 2001]. Untersuchungen von Scotcher et al. im Jahr 2005 kamen zu dem Ergebnis, dass wohl abrB0310 den eigentlichen Regulator darstellt [Scotcher et al., 2005].

Die potentiellen Bindestellen von AbrB im Promoterbereich von *spo0A* könnten eine zusätzliche Kontrolle der Expression von *spo0A* vor dem Beginn der Sporulation darstellen. Eine Feinregulation der *spo0A*-Transkriptmenge wäre so möglich. Immerhin ist der Vorgang der Sporulation ab einem bestimmten Zeitpunkt ein „Alles oder Nichts“-Ereignis. Sobald genügend aktives Spo0A~P vorhanden ist und der Sigma-Faktor σ^F in der Vorspore aktiviert wurde, gibt es kein Zurück. Die Zelle muss also sichere Kontrollmechanismen haben, um den für sie doch so gravierenden Schritt der Sporulation erst dann einzuleiten, wenn es keinen anderen Ausweg mehr gibt. So wäre es vorstellbar, dass die Bindung von AbrB als Repressor vor dem *spo0A*-Gen während des vegetativen Wachstums von *C. acetobutylicum* die Menge an Spo0A-Protein mit reguliert. Mehrere unterschiedliche Erkennungssequenzen von AbrB im Promoterbereich von *spo0A* könnten hierbei auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten von AbrB hinweisen und wie hintereinander geschaltene Verstärker des Effekts, d. h. der Repression wirken. Eine sehr fein abgestufte Regulation der *spo0A*-Expression wäre somit gewährleistet.

Auch in anderen Clostridien wurde der Promoterbereich von *spo0A* auf potentielle AbrB-Bindestellen hin untersucht. Dabei wurde ein Bereich ab ca. 50 Bp vor der putativen 0A-Box (vgl. Abb. 35) bis hin zum Startkodon von *spo0A* von *C. thermocellum* ATCC 27405, *C. beijerinckii* NCIMB8052, *C. difficile* 630, *C. perfringens* ATCC 13124, *C. kluyveri* DSM 555, *C. botulinum* A str. ATCC 19397, *C. sporogenes* NCIMB10696, *C. phytpfermentans* ISDg, *C. novyi* NT und *C. tetani* E88 des für die Suche verwendet. Mit Ausnahme von *C. kluyveri* DSM 555 waren in allen untersuchten Promoterbereichen mindestens eine bis maximal drei potentielle Bindestellen für das AbrB-Protein zu finden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind im Anhang (s. 7) dargestellt. Mehrere verschiedene Erkennungssequenzen von AbrB im Promoterbereich von *spo0A* könnten auch in diesen Clostridien auf eine zusätzliche Regulation der *spo0A*-Expression vor der Sporulation und unterschiedliche Bindungsaffinitäten von AbrB hinweisen. Auch hier könnten die unterschiedlichen AbrB-Bindestellen wie hintereinander geschaltene Verstärker der Repression wirken. Eine sehr fein abgestufte Regulation der *spo0A*-Expression wäre somit gewährleistet.

Die Positionen und die Anzahl der möglichen AbrB-Bindestellen waren bei allen untersuchten Clostridien verschieden (s. Anhang). Auffällig ist aber allgemein eine Aufeinanderfolge von mehreren Adeninbasen in der jeweiligen potentiellen Bindestelle von AbrB. Diese Poly-A-Sequenz ist in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße in allen Bindemotiven für AbrB für die verschiedensten Promoterregionen zu finden und ist essentiell für die Bindung. Ihre Bedeutung wurde bereits von Strauch im Jahr 1995 beschrieben [Strauch, 1995].

Aus den Promoterstudien von C. Hollergschwandner könnte daraus geschlussfolgert werden, dass bereits ein Austausch von 2 der insgesamt 4 aufeinander folgenden Adeninbasen der Erkennungssequenz, die mit dem P 1 überlappt, die Bindung des Repressors an diese Stelle im Promoterbereich von *spo0A* von *C. acetobutylicum* verhindert. Ob die Mutationen im Palindrom 2 aus der vorliegenden Arbeit bzw. sogar schon die einzelne Mutation in der Poly-A-Abfolge in diesem Palindrom 2 ausreichen, damit AbrB nicht mehr an diese Stelle binden kann, bleibt aufgrund fehlender Promoterstudien unklar. Eine erneute Klonierung der Wildtyp- und im Palindrom 2 mutierten Promotersequenz von *spo0A* vor das *lucB*-Gen des pLucBF-Vektors mit anschließenden Reportergenversuchen sollte diese Frage über die Messung der Luciferaseaktivität klären können. Zudem könnten weiterführende Gelretardationsexperimente mit aufgereinigtem AbrB-Protein und dem Promoterbereich von *spo0A* als Sonde eine Bindung des potentiellen Repressors bestätigen. Eine Übereinstimmung der tatsächlichen mit den in der vorliegenden Arbeit postulierten Bindestellen von AbrB im Promoterbereich von *spo0A* würden anschließende DNA-Schutzexperimente aufzeigen können.

4.3 Aktivierung von Spo0A durch Phosphorylierung

In *B. subtilis* erfolgt die Phosphorylierung von Spo0A über den Prozeß des sog. „phosphorelay“. Aufgrund von verschiedensten extra- und intrazellulären Signalen findet eine Autophosphorylierung der Kinasen A-E an einem konservierten Histidin-Rest statt, woraufhin der Phosphatrest über Spo0F und Spo0B letztendlich auf Spo0A übertragen wird [Burbulys et al., 1991]. Diese externen und internen Signale, die für die Initiation der Sporulation in *Bacillus subtilis* erforderlich sind, sind teilweise mit dem „phosphorelay“ verflochten (Abb. 1). Zu diesen gehören Signale über den Grad der DNA-Schädigung, Zelldichtesignale, Signale, die auf Nährstofflimitation hinweisen und Signale aus dem Citrat-Cyklus. Ein Mangel an Kohlenstoff-, Phosphat-, und Stickstoffquellen induziert die Sporulation vermutlich über eine Reduzierung des intrazellulären GTP-Spiegels. Die Konzentration an GTP und GDP fällt in sporulierenden Zellen. Das globale Repressorprotein CodY, dessen Fähigkeit, an DNA zu binden, mit der GTP-Konzentration korreliert, verliert dadurch diese

Gabe. Die Konsequenz daraus ist, dass CodY-regulierte Gene dereprimiert werden, wenn der GTP-Level nach Eintritt in die stationäre Phase fällt [Ratnayake-Lecamwasam et al., 2001]. Gene wie beispielsweise *phrA*, *phrE* und *kinB*, die allesamt für positive Regulatoren des „phosphorelay“ kodieren und deren Transkription normalerweise von CodY reprimiert wird [Molle et al., 2003], werden transkribiert und die Sporulation kann beginnen. Die Initiation der Sporulation wird auch von einer hohen Zelldichte gefördert [Grossmann und Losick, 1988]. Die Rap- („response regulator aspartyl phosphatase“) Proteine RapA, RapB und RapE dephosphorylieren normalerweise bei geringer Zelldichte die „phosphorelay“-Komponente Spo0F~P. So wird die Aktivierung von Spo0A verhindert und ein vermeintliches Sporulationssignal kompensiert. Bei hoher Zelldichte wird die Aktivität dieser Rap-Proteine durch PhrA, PhrE und CSF („competence- and sporulation-stimulating factor“) inhibiert. Die Dephosphorylierung von Spo0F~P wird verhindert und die Phosphorylierung von Spo0A und damit die Initiation der Sporulation kann erfolgen [Jiang et al., 2000a; Perego, 1997]. Ein intakter Krebs-Cyklus wirkt ebenso stimulierend auf die Initiation der Sporulation [Ireton et al., 1995], wobei die molekulare Basis dieser Abhängigkeit noch nicht geklärt ist. Inhibition der DNA-Replikation bzw. DNA-Schäden wirken dagegen hemmend auf die Sporulation [Ireton und Grossmann, 1992; Ireton et al., 1993; Ireton und Grossmann, 1994]. Das Protein Sda, das in dieser Situation durch Bindung von DnaA und LexA an seinen Promoterbereich vermehrt gebildet wird, beeinträchtigt die Autophosphorylierung der für die Phosphorylierung von Spo0A hauptsächlich verantwortlichen Kinase KinA [Rowland et al., 2004] und blockiert somit den „phosphorelay“. Die Initiation der Sporulation kann aber auch durch die Dephosphorylierung von Spo0A~P mit Hilfe der Proteine Spo0E, YisI und YnzD gestört werden [Ohlsen et al., 1994; Perego, 2001]. Auch das Genprodukt von *soj* kann durch die Repression von durch Spo0A~P aktivierten Genen, darunter auch Spo0A selbst, die Initiation der Sporulation negativ beeinflussen [Quisel und Grossman, 2000].

Als Mitglied der „response regulator“-Familie [Ferrari et al., 1985; Trach et al., 1985] und Teil eines Zwei-Komponenten-Systems ist Spo0A strukturell charakterisiert durch eine im Vergleich zu anderen Mitgliedern dieser Familie hoch-konservierte N-terminale Phosphat-Akzeptor-Domäne (vergleichbar mit der sog. CheY-Domäne aus *E. coli*) und eine individuelle DNA-Binde-Domäne am C-Terminus. Beide Domänen sind durch eine Art Scharnier, das eine variable AS-Sequenz aufweist, miteinander verbunden. Die CheY-artige „receiver“-Domäne (REC) stellt ein gemeinsames Element in einer Vielzahl von bakteriellen und archaeischen Signal-Übertragungs-Systemen dar [Galperin, 2006; Nixon et al., 1986; Stock et al., 1985; Stock et al., 2000; Trach et al., 1985; West und Stock, 2001] und ist eine evolutionär stabile und strukturell kompakte Einheit, deren Konformation nach Phosphorylierung an einem spezifischen Aspartat-Rest eine charakteristische Änderung

erfährt [Kern et al., 1999; Lee et al., 2001; Volz, 1993]. Diese Konformationsänderung ist ausschlaggebend für die Aktivität der DNA-Binde-Domäne. *In vivo*-Studien zeigten, dass der N-Terminus des *B. subtilis*-Spo0A die transkriptions-aktivierenden Eigenschaften des C-Terminus inhibiert. Dazu wurden Deletionsmutanten konstruiert und unter die Kontrolle eines induzierbaren Promoters gestellt [Ireton et al., 1993]. Nach Induktion des Promoters kam es zu einer „phosphorelay“-unabhängigen Initiation der Sporulation. Die Autoren identifizierten auch Mutationen (*sad* = *spo0A* deletion) in *B. subtilis*, welche die Expression von untersuchten Zielgenen in Abwesenheit des „phosphorelay“ oder der putativen Phosphatbindestelle aktivierten. Dies deutete darauf hin, wie auch nach Homologievergleichen verschiedener Transkriptionsfaktoren wie CheY oder OmpR vermutet, dass die N-terminale Domäne die Zugänglichkeit des C-Terminus inhibiert und so als Transkriptionsaktivator agieren kann. Eine andere Arbeitsgruppe um Green untersuchte kurze Deletionen im Aminoterminal von Spo0A, die die Aktivität des Proteins ebenfalls unabhängig von einer Phosphorylierung machten [Green et al., 1991]. Durch die Konformationsänderung der Akzeptor-Domäne nach Phosphorylierung wird in *B. subtilis* die DNA-Binde-Domäne demnach frei und Spo0A kann so seine Funktion als Repressor oder Aktivator von für die Sporulation nicht mehr benötigten vegetativen bzw. genau für die Sporulation benötigten Genen durch Bindung an spezifische Erkennungssequenzen (0A-Boxen) ausüben. Dabei kann die DNA-Binde-Domäne von verschiedenen „response regulators“ auf verschiedenste Weise variieren. Beispielsweise werden Binde-Domänen vom NarL-, Spo0A-Typ (REC-HTH) oder OmpR-, PhoB-Typ (REC-wHTH („whinged helix“)) unterschieden, wobei die „receiver“-Domäne, die sich hier am N-Terminus befindet, auch am C-Terminus liegen kann [Galperin, 2006]. Diese strikte Unterscheidung zwischen aktivem, phosphoryliertem und inaktivem, nicht phosphoryliertem Stadium eines „response regulator“ trifft allerdings nicht immer zu. Am Beispiel von CheY zeigten kristallographische Untersuchungen ein Zwischenstadium, d. h. auch in nicht phosphoryliertem Zustand konnte CheY aktiv sein und an sein Zielprotein FliM binden [Dyer und Dahlquist, 2006; Stock und Guhaniyogi, 2006].

Trotz vieler Ähnlichkeiten im Sporulationsprozess bei Bacilli und Clostridia existieren in allen bis jetzt sequenzierten Clostridia die „phosphorelay“-Komponenten Spo0F und Spo0B nicht. Es wurden weder homologe Gene zu diesen beiden Komponenten, noch potentielle Kandidaten mit einer signifikanten Ähnlichkeit zu den verschiedenen Signal-übertragenden Kinasen aus *B. subtilis* gefunden. Auch homologe Gene zu den Rap- („response regulator aspartyl phosphatase“) Proteinen RapA, RapB und RapE, die normalerweise bei geringer Zelldichte die „phosphorelay“-Komponente Spo0F~P dephosphorylieren und so die Aktivierung von Spo0A verhindern, fehlen. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass Spo0A in

Clostridien auf eine andere Art und Weise phosphoryliert wird und die Initiation der Sporulation andere Signale benötigt als in Bacilli [Dürre und Hollergschwandner, 2004; Paredes et al., 2005; Stephenson und Hoch, 2002; Stephenson und Lewis, 2005]. Das könnte durch die unterschiedlichen, äußeren Bedingungen erklärt werden, die bei diesen beiden Gattungen zur Auslösung des Sporulationsprozesses führen. Im Gegensatz zu Bacilli, in welchen die Sporulation eine Antwort auf Nährstoffmangel ist, sporulieren Clostridia, um den lebensfeindlichen Bedingungen in Folge der Produktion von organischen Säuren, dem darauffolgendem Absinken des internen und externen pH-Wertes und dem folglich drohenden Zusammenbruch des Protonen-Gradienten über der Cytoplasmamembran zu entkommen [Dürre et al., 2002].

Von *B. subtilis* ist bekannt, dass die Initiation der Sporulation von der Konzentration an Spo0A und dessen Phosphorylierungsgrad abhängt [Hoch, 1993; Perego et al., 1989; Quisel et al., 2001]. Um die Expression verschiedener Gene zu aktivieren oder zu reprimieren, muss, wie bereits erwähnt, der Transkriptionsfaktor Spo0A, wie viele andere „response regulators“ auch, erst durch Phosphorylierung aktiviert werden [Stock et al., 1989]. Gleiches gilt auch für das Spo0A-Protein in *C. acetobutylicum*, wobei die Phosphorylierungsstelle am Aspartat an Position 58 eine entscheidende Rolle spielt. Durch Untersuchungen der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von Spo0A aus *B. stearothermophilus* [Lewis et al., 1999; Muchova et al., 1999], konnte, wie für *B. subtilis* auch schon vermutet [Burbulys et al., 1991; Green et al., 1991; Ireton et al., 1993], die Aktivierung von Spo0A durch Phosphorylierung der Aminosäure D56 in der N-terminalen Domäne gezeigt werden. Wie in folgender Abb. 39 zu sehen wird, ist der Bereich des Kodons 56, bzw. in *C. acetobutylicum* des Kodons 58, in allen dargestellten Organismen hoch konserviert.

Abbildung 39 (nächste Seite): Vergleich der N-terminalen „receiver“-Domäne von Spo0A aus verschiedenen Organismen mit CheY aus *E. coli*. Dargestellt ist die AS-Sequenz des N-terminalen Teils des Spo0A-Proteins aus verschiedenen Organismen, wobei vollständige Übereinstimmungen in der Sequenz mit dunkelgrauen Kästchen markiert sind. Übereinstimmungen in über 50 % sind mittelgrau markiert. Hellgrau: !: I oder V; \$: L oder M; #: N oder D oder Q oder E oder B oder Z. Die Phosphorylierungsstelle am Aspartatrest (D56 in *B. subtilis* bzw. D58 in *C. acetobutylicum*) ist in allen dargestellten Organismen hoch konserviert und ist mit einem roten Kasten angezeigt. Verwendete Stämme: *E. coli* K12 MG1655, *B. subtilis*, *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. perfringens* ATCC 13124, *C. novyi* NT, *C. kluyveri* DSM 555, *C. botulinum* A str. ATCC 19397, *C. sporogenes* NCIMB10696, *C. tetani* E88, *C. beijerinckii* NCIMB8052, *C. difficile* 630, *C. thermocellum* ATCC 27405 und *C. phytofermentans* ISDg. Der AS-Vergleich wurde erstellt mit dem im Internet frei verfügbaren Programm „MultAlin“ (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>; Version 5.4.1.).

Diskussion

	1					50
<i>E. coli</i>	MADK	ELKFLVVDDF	STMRRIVRN	LK.ELGFNNV	EEAEDGVDA	L
<i>B. subtilis</i>	ME	KIKVCVADDN	RELVSLLSEY	IEGQEDMEVI	GVAYNGQECL	
<i>C. acetobutylicum</i>	MESR	KISVLIADDN	KEFCNINLNDY	LLNQSDMIVV	GIAKDGVEAL	
<i>C. perfringens</i>	MKES	KISVLIADDN	KEFCNINLNDY	LLSQRDIVVT	GIAKDGLEAL	
<i>C. novyi</i>	MDNN	KISVVIADDN	KEFCNINLNDY	LLNQRDIVVT	GVAKDGIEAL	
<i>C. kluyveri</i>	MEES	KISVVIADDN	KEFCNINLNDY	LLNQRDIMVT	GIAKDGVEAL	
<i>C. botulinum</i>	MEET	KINVIIADDN	KEFCNINLSDY	LLNQRDIMVT	GIANDGVEAL	
<i>C. sporogenes</i>	MEET	KINVIIADDN	KEFCNINLSDY	LLNQRDIMVT	GIANDGVEAL	
<i>C. tetani</i>	VKGSIFMENS	KISIVIADDN	KEFCNINLSDY	LSNQKDIEVV	GIGKDGVEAI	
<i>C. beijerinckii</i>	MEDS	KISVLIADDN	KEFCNINLNDY	LLNQKDIVVT	GIAKDGREAL	
<i>C. difficile</i>	...MGGFLVE	KIKIVLADDN	KDFCQVLKEY	LSNEDDIDIL	GIAKDGIEAL	
<i>C. thermocellum</i>	MTSN	KIRVVIADDN	REFGDILYEV	LNNQEDIEVV	GVARDGIEAY	
<i>C. phytofermentans</i>	MG	KISVVIADDN	IRMLNLLEE	LKNDNVEVI	GRAENGLEAL	

Konsensusm... KIs!..aDDN kefcniL.#y Lln#.Di!. GiAk#G.EAL

	51					100
<i>E. coli</i>	NKLQAGGYGF	VISDWNMPNM	DGLELLKTIR	.ADGAMSALP	VLMVTAEAKK	
<i>B. subtilis</i>	SLFKEKDPDV	LVLDIIMPHL	DGLAVLERLR	.ESDLKKQPN	VIMLTAFGQE	
<i>C. acetobutylicum</i>	KLIENKKPDL	VVLDIIMPHL	DGLGVLEKLN	.NKDAENLPR	IIVLSAVGQD	
<i>C. perfringens</i>	KLIEEKQPD	VVLDIIMPHL	DGLGVLERIN	.SLGLEKTTPR	VIVLSAVGQD	
<i>C. novyi</i>	KLIQEKPPDL	LILDIIMPHL	DGLGVLEKIN	.TMNIEKLPR	VIVLSAVGQD	
<i>C. kluyveri</i>	KLIEEKRPDL	VVLDIIMPHL	DGLGVLEELN	.NMNMEPMR	IIVLSAVGQD	
<i>C. botulinum</i>	KLVEEKPPDL	IILDIIMPHL	DGLGVLEKLN	.SIDITPMR	VIVLSAVGQD	
<i>C. sporogenes</i>	KLVEEKPPDL	IILDIIMPHL	DGLGVLEKLN	.SIDITPMR	VIVLSAVGQD	
<i>C. tetani</i>	KLIEEKPPDL	VVLDIIMPHL	DGLGVLEKLN	.SIATDYMPR	VILLSAVGQD	
<i>C. beijerinckii</i>	ELIVERKPD	VILDIIMPHL	DGLGVLEKLN	.TMQLEKVR	IIVLSAVGQD	
<i>C. difficile</i>	DLVKKTPDL	LILDIIMPHL	DGLGVLEKLN	.TMDIPKMPK	IIVLSAVGQD	
<i>C. thermocellum</i>	ELIVEKLPDI	AILDIIMPHL	DGLGVLEKIG	.ATAISKRP	FILLSAVGQD	
<i>C. phytofermentans</i>	EVIKDKNP	VLLDLIMPKL	DGLGVMEKIK	KSSEFKKAPS	FIVITAIGQE	

Konsensus kli.ek.PDl v!LDiIMPhL DGLgV\$Eklnk.Pr vIvlsAvGQ#

	101					150
<i>E. coli</i>	ENIIAAQAG	ASGVVVKPFT	AATLEEKLNK	IFEKLG...		
<i>B. subtilis</i>	DVTKKAVDLG	ASYFILKPFD	MENLVGHIRQ	VSGNASSVTH	RAPSSQSSII	
<i>C. acetobutylicum</i>	KITQRAITLG	ADYYVVKPFD	MDVFTNRIRE	MFNNTISNSE	QKRSYQVEEK	
<i>C. perfringens</i>	KITQRAITLG	ADYYVVKPFD	MDVFTNRIRE	MFNSTISEEP	TNSKPTISVV	
<i>C. novyi</i>	KITQRAITLG	ADYYVVKPFD	MDVFTKRIRQ	MFNNTISNEG	VKKATPIIES	
<i>C. kluyveri</i>	KITQRAITLG	ADYYVVKPFD	MDVFTQIRIQ	MFNSVISSGE	DIKKTVSFID	
<i>C. botulinum</i>	KITQRAINLG	ADYYVVKPFD	MDVFTKRIRQ	MFNNTISSEE	VRRPVVMPET	
<i>C. sporogenes</i>	KITQRAINLG	ADYYVVKPFD	MDVFTKRIRQ	MFNNTISSEE	VRRPVVMPET	
<i>C. tetani</i>	KITQRAINLG	ADYYVVKPFD	MEIFVKRIRQ	MFNNTISGES	VRINNIPATQ	
<i>C. beijerinckii</i>	KITQQAITLG	ADYYTVKPFD	MEVFTKRIRE	MFNSSAAVQE	TNMRSYASS	
<i>C. difficile</i>	KITQSAINLG	ADYYIVKPFD	FVVFINRIRE	LVSNRVTQVE	PKPRPVQETQ	
<i>C. thermocellum</i>	KITQRALALG	AEYYVVKPFD	MEVLISRIRQ	LKNVNQPNVI	RQDGLSGEVK	
<i>C. phytofermentans</i>	RVTENAFELG	ASYIILKPFD	NNTVLSRIKQ	LKADYHIKLV	DNHKLNTFDN	

Konsensus k!TqrAi.LG AdYY!vKPFD m.vft.rIr# mfn.n.is... ..

	151
<i>E. coli</i>	
<i>B. subtilis</i>	RSSQPEPKK
<i>C. acetobutylicum</i>	EASFAGT..
<i>C. perfringens</i>	EGSKSE...
<i>C. novyi</i>	GDIQVP...
<i>C. kluyveri</i>	AGEVRF...
<i>C. botulinum</i>	CSQEKI...
<i>C. sporogenes</i>	CSQEKIS..
<i>C. tetani</i>	
<i>C. beijerinckii</i>	MISTPSE..
<i>C. difficile</i>	MTRS.....
<i>C. thermocellum</i>	SSYHPPQ..
<i>C. phytofermentans</i>	PAAYKEK..

Konsensus

In einer vorangegangenen Arbeit von C. Hollergschwandner konnte durch den Austausch von Aspartat mit der um eine CH₂-Gruppe verlängerten Aminosäure Glutamat mit Sam 58 ein Spo0A-Protein hergestellt werden, das unabhängig von einer Phosphorylierung agieren und an den Promoterbereich von *adc* binden kann [Hollergschwandner, 2003].

Gewöhnlich erhalten „response regulators“ ihre Phosphatgruppe direkt von einer verwandten Histidin-Kinase, aber auch nicht verwandte Kinasen oder niedermolekulare Phosphodonatoren wie Acetylphosphat oder Carbamylphosphat vermögen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen „response regulator“ zu phosphorylieren [McCleary et al., 1993].

Paredes und seine Mitarbeiter haben sich mit verschiedenen Wegen der Phosphorylierung beschäftigt und diskutierten dabei drei unterschiedliche Möglichkeiten der Phosphorylierung von Spo0A bei Clostridien [Paredes et al., 2005].

Am wahrscheinlichsten scheint es, dass Spo0A in Clostridien über ein mehr oder weniger klassisches Zwei-Komponenten-System, also direkt von einer bzw. mehreren Histidin-Kinasen phosphoryliert wird [Paredes et al., 2005; Stephenson und Hoch, 2002; Stragier, 2002]. Aus *Bacillus subtilis* ist bekannt, dass KinA, wenn auch sehr ineffizient, Spo0A direkt phosphorylieren kann [Trach und Hoch, 1993]. Auch KinC ist in der Lage, verschiedene Mutanten von Spo0A zu phosphorylieren [Fabret et al., 1999]. Aus diesem Grund wurde in *C. acetobutylicum* nach Kinasen gesucht, die möglicherweise ebenso in der Lage sein könnten, Spo0A direkt zu phosphorylieren. Da in *B. subtilis* alle 5 Sporulationskinasen als sog. „orphan“-Histidin-Kinasen bezeichnet werden, was bedeutet, dass in der näheren Nachbarschaft ihrer Gene kein zugehöriger „response regulator“ lokalisiert ist, wurde auch in *C. acetobutylicum* nach solchen „verweisten“ Histidin-Kinasen gesucht. Von den insgesamt 37 Histidin-Kinasen von *C. acetobutylicum* werden 7 zu den „orphans“ gezählt (CAC0317, CAC0323, CAC0437, CAC0863, CAC0903, CAC2730, CAC3319; [Doß et al., 2005]). Vier davon (CAC0317, CAC0323, CAC0863 und CAC2730) weisen allerdings einen „response regulator“ in ihrer weiteren Nachbarschaft auf, d. h. zwei bis vier Gene liegen dazwischen. Ein Vergleich der Expressionsprofile der fünf „phosphorelay“-Kinasen aus *B. subtilis* mit denen der Kinasen aus *C. acetobutylicum* ließ Paredes und seine Mitarbeiter schlussfolgern, dass CAC0437, CAC0323, CAC0903 und CAC2730 potentielle Kandidaten für die Phosphorylierung von Spo0A sein könnten [Alsaker und Papoutsakis, 2005; Paredes et al., 2005]. Das Expressionsprofil von CAC3319 passt zu keiner der 5 Kinasen aus *B. subtilis*. Wenn also sowohl das Expressionsprofil als auch die Anwesenheit eines „response regulator“ in der weiteren Nachbarschaft berücksichtigt werden, bleiben für die Phosphorylierung von Spo0A eigentlich nur noch die potentiellen Kinasen CAC0437 und CAC0903 übrig. Für die

„phosphorelay“-Kinasen aus *B. subtilis* wurde aber gezeigt, dass der Zeitpunkt der höchsten Genexpression nicht unbedingt mit dem Zeitpunkt in der Wachstumsphase korreliert, in der sie auch ihre Funktion ausüben [Jiang et al., 2000b]. Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit die Kinasen CAC0323, CAC0437, CAC0903, CAC2730 und CAC3319 durch den Versuch der Überexpression mit anschließenden Phosphorylierungsversuchen bzw. mit Hilfe des „ClosTron® Gene Knockout System“ untersucht. Die Überexpression der verschiedenen Kinasen in *E. coli* gestaltete sich sehr schwierig, unabhängig von dem Expressionssystem, das verwendet wurde. Trotz des positiven Nachweises eines Transkripts aller getesteten Kinasegene nach Induktion mit IPTG (mit Ausnahme des Gens CAC0323; von CAC3319 war die Transkription gar nicht getestet worden), konnte lediglich die Kinase 3 (kodiert von CAC0437) unter Verwendung des Vektors pET-28(a)+ und des Expressionsstammes *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) im Zellsediment nachgewiesen werden. Das *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment zeigte kein Ergebnis, wobei hier ein methodischer Fehler nicht ausgeschlossen werden kann. Trotzdem dürfen auch für eine positive Phosphorylierungsreaktion *in vivo* eventuell nötige Liganden, die für die Aktivierung der verschiedenen Kinasen unterschiedlich sein können und auch abhängig von der Wachstumsphase präsent sein können oder nicht, nicht unbeachtet bleiben. Gleiches wurde bereits für die Sporulationskinasen aus *B. subtilis* vermutet [Jiang et al., 2000b]. Nicht funktionierende *in vitro*-Phosphorylierungsversuche müssen demnach nicht unbedingt auch *in vivo* nicht funktionieren, da in aufgereinigten Proteinproben die für die Aktivierung der jeweiligen Kinasefunktion eventuell nötigen Liganden und Signale fehlen. Obwohl für die Kinasen aus *B. subtilis* bis jetzt noch keiner dieser Liganden identifiziert wurde, spielen diese wohl eine wichtige Rolle in der zeitlichen Organisation der stationären Phase und der weiteren Entwicklung [Jiang et al., 2000b].

Weitaus viel versprechender, die für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortliche(n) Kinase(n) zu identifizieren, waren die Versuche, die verschiedenen Kinasegene mit Hilfe des „ClosTron® Gene Knockout System“ auszuschalten. In anschließenden Wachstumsversuchen mit den Mutanten und Überprüfung der Sporulationsfähigkeit hätte es unter weitaus natürlicheren Bedingungen möglich sein sollen, die Art und Weise der Spo0A-Phosphorylierung nachzuvollziehen. Aus zeitlichen Gründen war die vollständige Durchführung des Experiments nicht möglich. Ein Defekt in der Sporulationsfähigkeit der jeweiligen Mutante hätte aber noch lange nicht bedeutet, dass die fehlende Kinase nicht in der Lage ist, Spo0A zu phosphorylieren. Wie aus *B. subtilis* bekannt ist, ist z. B. KinC, deren Expression in der ersten Stunde der stationären Phase am höchsten ist, zusammen mit KinD, die vor allem während des vegetativen Wachstums gebildet wird, zwar mit für die Bildung von Spo0A~P verantwortlich. Unabhängig davon, ob sie Spo0A direkt phosphorylieren oder

den Phosphatrest indirekt über Spo0F auf Spo0A übertragen, reicht die Menge an Spo0A~P aber nur aus, um die Transkription von *abrB* zu reprimieren. Die Menge ist aber nicht ausreichend für die Einleitung der Sporulation [Jiang et al., 2000b; LeDeaux et al., 1995]. Demnach sollte auch in *C. acetobutylicum* ein Zusammenspiel von mehreren Kinasen, die möglicherweise auch verschiedene Liganden zur Aktivierung benötigen, unbedingt mitberücksichtigt werden und dementsprechende Kombinationen von ausgeschalteten Kinasegenen getestet werden.

Neben der direkten Phosphorylierung von Spo0A durch eine oder mehrere Kinasen gibt es aber noch andere Möglichkeiten der Phosphatübertragung auf Spo0A.

Eher unwahrscheinlich gilt die Existenz eines clostridiellen „phosphorelay“-Systems. Wenn die Phosphorylierung von Spo0A über verschiedene Phosphatüberträger funktioniert, müssten diese, aufgrund hoher Konserviertheit der verschiedenen Protein-Protein bzw. Protein-DNA-Interaktionsdomänen der „phosphorelay“-Komponenten von verschiedenen Bacilli [Stephenson und Hoch, 2002], ebenfalls diese wichtigen Eigenschaften und strukturellen Merkmale haben [Paredes et al., 2005], um optimal miteinander interagieren zu können. Bis jetzt konnten allerdings keine derart gestalteten „phosphorelay“-Elemente in Clostridien identifiziert werden. Von Stephenson und Lewis wurde vielmehr die Entwicklung des aus Bacilli bekannten „phosphorelay“ aus „Vorläufer“-Spo0A- und Sensorkinasedomänen als wahrscheinlicher angesehen. Dies würde die hohe Flexibilität und Fähigkeit der unterschiedlichsten Signalerkennung erklären, die verschiedene Bacilli aufgrund der Anpassung an ganz verschiedene Habitate aufweisen [Stephenson und Hoch, 2002; Stephenson und Lewis, 2005].

Eine andere Möglichkeit für die Phosphorylierung von Spo0A, die auf keinen Fall unbeachtet bleiben darf, stellt die Übertragung eines Phosphatrestes von verschiedenen niedermolekularen Phosphatdonoren auf Spo0A dar. Dabei könnten beispielsweise Butyryl~P oder Acetyl~P eine Rolle spielen. Aus *E. coli* ist bekannt, dass Acetyl~P neben der Funktion als wichtiges Stoffwechselintermediat auch eine äußerst wichtige regulatorische Aufgabe als Signalüberträger hat [Wolfe, 2005]. Bereits Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde Acetyl~P von McCleary und seinen Mitarbeitern als globales Signal bezeichnet [McCleary et al., 1993], das in der Lage ist, Phosphat auf bestimmte Mitglieder der Familie von Zwei-Komponenten-Systemen zu übertragen [Lukat et al., 1992]. *In vitro* kann Acetyl~P verschiedene „response regulators“ von *E. coli*, darunter z. B. CheY, OmpR, NarL, ComA und PhoB phosphorylieren. *In vivo* reguliert Acetyl~P die Expression des *flhDC*-Operons durch Phosphorylierung von OmpR, das an den Promoter des Operons bindet und die

Transkription von Flagellengen vermindert [Wolfe, 2005]. Zhao et al. untersuchten im Jahr 2004 die intrazellulären Acetyl~P- und Butyryl~P-Konzentrationen in *C. acetobutylicum* und deren Bedeutung und Auswirkung auf die Lösungsmittelbildung [Zhao et al., 2005]. Zeitgleich mit der Initiation der Lösungsmittelbildung hatten die Autoren einen hohen Gehalt an Butyryl~P, nicht an Acetyl~P beobachtet. Gleichzeitig ergab eine Analyse der Gentranskription, dass ein hoher Gehalt an Butyryl~P mit der Hochregulierung von Genen korreliert, die für die Lösungsmittelbildung und Stressantwort verantwortlich sind. Daneben wurde die Transkription von Flagellen- und Chemotaxisgenen herunter reguliert. Ein Zusammenhang zwischen dem Butyryl~P-Gehalt und der Initiation der Lösungsmittelbildung bzw. mit der damit verbundenen Sporulation ist daher denkbar. Spo0A, als positiver Transkriptionsregulator der Sporulationsgene, aber auch der Gene *adhE* (*aad*), *ctfA*, *ctfB* und *adc* für die Lösungsmittelbildung [Harris et al., 2002; Thormann et al., 2002], könnte durch Butyryl~P phosphoryliert werden und daraufhin seine Funktion als globaler Regulator der Sporulation und der Lösungsmittelbildung in Butyrat-bildenden Clostridien ausführen. In Clostridien, die während ihres Wachstums kein Butyrat produzieren, wäre auch Acetyl~P als Phosphatdonor denkbar [Paredes et al., 2005].

4.4 Der Transkriptionsstartpunkt von CAC3156 in *C. acetobutylicum*

Mit Hilfe von „primer extension“-Experimenten mit radioaktiver Markierung wurde der Transkriptionsstartpunkt des Gens CAC3156, das für ein *YazC* *B. subtilis* orthologes uncharakterisiertes Protein kodiert, bestimmt. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde zusätzlich mit einem im Internet frei verfügbaren Programm „Berkeley Drosophila Genome Project“ (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) für die Vorhersage von Promoterregionen in Prokaryoten der Transkriptionsstartpunkt für das Gen CAC3156 gesucht. In folgender Abbildung 40 sind die mit dem genannten Programm gefundenen sowie der in der vorliegenden Arbeit bestimmte Transkriptionsstartpunkt in verschiedenen Farben im Bezug auf ihre Position im Promoterbereich von CAC3156 dargestellt. Der Übersicht halber ist das Operon CAC3156-CAC3153 auf dem kodierenden Strang gezeichnet.

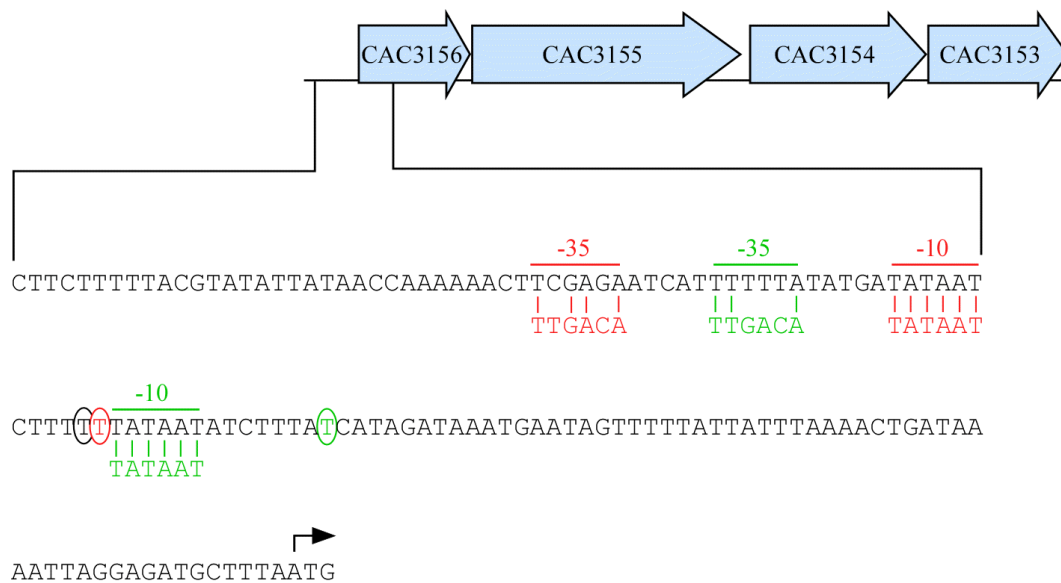


Abbildung 40: Potentielle Transkriptionsstartpunkte von CAC3156. Dargestellt ist die transkriptionelle Einheit CAC3156-CAC3153 und auszugsweise die Promoterregion von CAC3156. schwarzer Kreis: in vorliegender Arbeit mit Hilfe von „primer extension“-Experimenten mit radioaktiver Markierung erhaltener Transkriptionsstartpunkt 72 Bp vor dem Translationsstart von YazC. grün: mit Internet-Programm erhaltener Transkriptionsstartpunkt und dazu abgeleitete -10- und -35-Regionen („score“: 1,0). rot: mit Internet-Programm erhaltener Transkriptionsstartpunkt und dazu abgeleitete -10- und -35-Regionen („score“: 0,73). Der Translationsstart des YazC *B. subtilis* orthologen uncharakterisierten Proteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Ausgehend von dem in voneinander unabhängigen „primer extension“-Experimenten ermittelten Transkriptionsstartpunkt 72 Bp vor dem Translationsstart des Proteins, konnten -10- und -35-Regionen eines σ^A -abhängigen Promoters abgeleitet werden (in Abb. 40 übereinstimmend mit den Regionen des in rot dargestellten Transkriptionsstartpunktes). Der Abbildung 40 ist außerdem zu entnehmen, dass die größte Übereinstimmung der abgeleiteten -10- und -35-Regionen mit der Konsensussequenz der Regionen eines σ^A -abhängigen Promoters bei dem in rot dargestellten Transkriptionsstartpunkt 71 Bp vor dem Translationsstartpunkt des Proteins besteht. Obwohl der in grün dargestellte Transkriptionsstartpunkt von dem Programm als „wahrscheinlicher“ angesehen wird („score“: 1,0) als der rote („score“: 0,73) und da geringe Abweichungen zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen normal sind, kann der 71 Bp vor dem Startkodon lokalisierte Transkriptionsstartpunkt als Transkriptionsstartpunkt von CAC3156 angenommen werden.

In *B. subtilis* ist *yazC*, wie im Internet auf der Seite (<http://biocyc.org/BSUB224308/NEW-IMAGE?type=GENE-IN-MAP&object=BSU0097>) beschrieben ebenfalls in einem Operon organisiert, das hier aus 5 Genen besteht und im Genom von Base 112797 bis 116534 lokalisiert ist. In folgender Abbildung 41 sind die Organisation dieses Operons und die 5'- bzw. 3'-flankierenden Gene dargestellt.

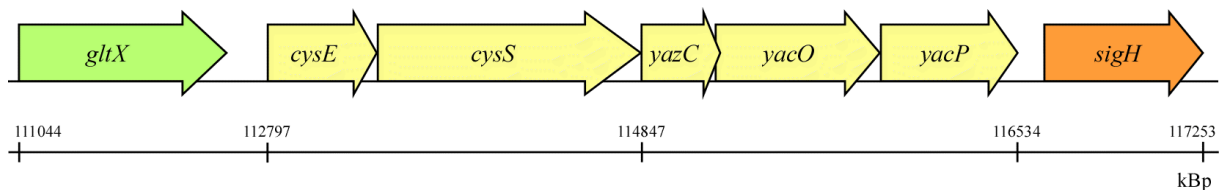


Abbildung 41: Schematische Darstellung der offenen Leserahmen in der Region um das Gen *yazC* von *B. subtilis*. Innerhalb des die DNA repräsentierenden Balkens ist die Lage und die Transkriptionsrichtung der offenen Leserahmen angeben, die Zuordnung zur Lage im Genom ist durch Angabe der Basen oberhalb des Balkens möglich. Die offenen Leserahmen sind wie folgt annotiert: *gltX*: „glutamyl-tRNA synthetase“, *cysE*: „serine acetyltransferase“, *cysS*: „cysteinyl-tRNA synthetase“, *yazC*: „hypothetical protein“, *yacO*: „hypothetical protein, possible tRNA/rRNA methyltransferase“, *yacP*: „hypothetical protein“, *sigH*: „Spo0H, RNA polymerase sigma factor“ [Kunst et al., 1997].

Ein Vergleich der beiden Operone aus *B. subtilis* (Abb. 41) und *C. acetobutylicum* (Abb. 32) zeigt trotz großer Ähnlichkeit keine identische Genorganisation. In beiden Fällen ist aber eine räumliche Nähe des *yazC*-Gens zu dem *sigH*-Gen bzw. des Gens CAC3156 zu dem *sigH*-ähnlichen CAC3152 auffällig. Hinweise darauf, dass das Operon CAC3156-3153 in *C. acetobutylicum* zusätzlich von einem σ^H -abhängigen Promoter aus transkribiert wird, konnten nicht gefunden werden.

Das YazC-Protein aus *B. subtilis* besitzt wie auch das YazC *B. subtilis* orthologe uncharakterisierte Protein aus *C. acetobutylicum* eine Ribonuklease_3-Domäne. Eine zusätzliche C-terminale, doppelsträngige RNA-bindende Domäne, wie es beispielsweise bei dem RncS-Protein, das von CAC1748 kodiert wird, der Fall ist, fehlt in beiden Fällen.

5.a Zusammenfassung

1. In *Clostridium acetobutylicum* wird *spo0A*, wie auch in *Bacillus subtilis*, von zwei, zu verschiedenen Zeitpunkten im Wachstum aktiven Transkriptionsstartpunkten aus transkribiert. Radioaktive „primer extension“-Experimente bestätigten einen Startpunkt (S1), der 164 Bp vor dem Startkodon von *spo0A* liegt und dessen abgeleitete -10- und -35-Regionen Ähnlichkeit zu σ^A -abhängigen Promotoren zeigen. 54 Bp vor dem Startkodon von *spo0A* konnte ein zweiter, sporulationsspezifischer Startpunkt (S3) lokalisiert werden, dessen abgeleitete -10- und -35-Regionen Ähnlichkeit zu σ^H -abhängigen Promotoren zeigen. Das aus *B. subtilis* bekannte Promoter-„switching“ konnte in *C. acetobutylicum* in dem Sinne nicht beobachtet werden. Die Transkription von *spo0A* von S3 aus scheint die Bildung von der für die Sporulation nötigen Menge an Spo0A-Protein lediglich zu unterstützen. So können also die Erkenntnisse über die Transkription von *spo0A* aus *B. subtilis* nicht eins zu eins auf *C. acetobutylicum* übertragen werden.
2. In der vorliegenden Arbeit wurde das Palindrom 2 in der Promoterregion von *spo0A* mit Hilfe einer SOE-PCR in 6 von 12 Basen mutiert, ein Einfluß auf die Expression von *spo0A* konnte mit Hilfe von Reportergenversuchen aufgrund von Mutationen in den jeweiligen pLucBF-Plasmiden nicht nachgewiesen werden.
3. Bei näherer Betrachtung der beiden palindromischen Sequenzen in der Promoterregion von *spo0A* wurden Hinweise auf die Beteiligung eines Regulatorproteins bei der Regulation der *spo0A*-Expression gefunden. Beide palindromischen Sequenzen überlappen jeweils mit einer potentiellen Bindestelle für das Repressorprotein AbrB, dessen Bindung im Promoterbereich von *spo0A* eine zusätzliche Kontrolle und eine Feinregulierung der Expression von *spo0A* vor dem Beginn der Sporulation darstellen könnte. Auch in anderen Clostridien lassen sich potentielle Bindestellen für AbrB im *spo0A*-Promoterbereich finden. Somit kann auch dort eine zusätzliche Kontrolle der *spo0A*-Expression durch AbrB postuliert werden.
4. Die Überexpression der potentiell für die Phosphorylierung in Frage kommenden „orphan“-Histidin-Kinasen aus *C. acetobutylicum* war trotz unterschiedlicher Expressionssysteme nur im Fall von Kin3 (kodiert von CAC0437) erfolgreich. Ein *in vitro* Phosphorylierungsversuch von Spo0A blieb allerdings erfolglos.
5. Mit Hilfe des „ClosTron® Gene Knockout System“ zur Ausschaltung der für die Phosphorylierung von Spo0A in Frage kommenden Kinase(n) sollten die Gene CAC0323, CAC0437, CAC0903 und CAC3319 untersucht werden. Durch eine einfache Ein-Schritt-SOE-PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden konnten zwei Erkennungssequenzen für

die Intron-RNA allen gewünschten Zielgenen angepasst werden. Eine Ausnahme stellte nur CAC3319 dar, für das die Intron-DNA nur für eine Insertionsstelle angepasst werden konnte.

6. Unter Verwendung von radioaktiven „primer extension“-Experimenten konnte der Transkriptionsstartpunkt des Operons CAC3156-CAC3153 71 Bp vor dem Translationsstart lokalisiert werden. Davon ausgehend konnten -10- und -35-Regionen eines σ^A -abhängigen Promoters abgeleitet werden.

5.b Summary

1. Radioactive primer extension experiments revealed two different transcription start points for *spo0A* in *C. acetobutylicum*. Like in *B. subtilis* the activity of the two start points are depending on the growth phase. The signal S1 is located 164 bp upstream of the Spo0A translation startpoint and allowed to identify a clear σ^A -dependent -10- and -35-sequence. A σ^H -dependent -10- and -35-promoter sequence can be postulated from the other signal S3 located 54 bp upstream of the *spo0A* gene. But in *C. acetobutylicum* there does not exist the known promoter switching from *B. subtilis*. The second transcription start point is active only awhile in the stationary phase. It seems that the transcription of *spo0A* from this start point allows the organism to increase the amount of *spo0A* transcript momentarily over a critical level, so sporulation can be initiated in due time.
2. Using SOE-PCR, 6 of 12 bases of the Pa 2 in the intergenic region upstream of the *spo0A* gene were mutated. However, because of mutations in the recombinant pLucBF-plasmids no reporter gene experiments could be carried out.
3. There are hints that there is a regulator protein involved in regulation of *spo0A* expression. Closer inspections showed an overlapping of the palindromic sequences with potential binding sites of the repressor protein AbrB. Binding of AbrB at the promoter region of *spo0A* could mean an additional control and very precise regulation of *spo0A* expression before initiation of sporulation. In other clostridia, there are also potential binding sites of AbrB in the promoter region of *spo0A*. So similar regulation of *spo0A* expression can be postulated.
4. Independent of the expression system, overexpression of potential Spo0A phosphorylating orphan histidine kinases was not successful with the exception of Kin3 (encoded by CAC0437). Also, *in vitro* phosphorylation assays were without success.
5. Using the ClosTron[®] Gene Knockout System to identify the kinase responsible for Spo0A phosphorylation two recognition sites for Intron-RNA could be adapted to all target genes (CAC0323, CAC0437, CAC0903) via one-step-SOE-PCR. In the case of CAC3319 an adaptation of the intron-RNA was possible only for one insertion site.
6. A 5'-end for the CAC3156-CAC3153 transcript was determined by radioactive primer extension experiments. The signal 71 bp upstream of the gene CAC3156 allowed to deduce a clearly σ^A -dependent -10- and -35-sequence.

Literaturverzeichnis

- 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
- Alsaker K. V. und E. T. Papoutsakis. 2005.** Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **187**: 7103-7118
- Andersch W., H. Bahl und G. Gottschalk. 1982.** Acetone-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in an ammonium-limited chemostat at low pH values. *Biotechnol. Lett.* **4**: 29-32
- 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. und G. Gottschalk. 1984.** Parameters affecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **14**: 215-223
- Berlyn M. K., K. B. Low und K. E. Rand. 1996.** Linkage Map of *Escherichia coli* K12. 9. Ausgabe. S: 1715-1902. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA
- Bertram J. und P. Dürre. 1989.** Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 551-557
- Bertram J., A. Kuhn und P. Dürre. 1990.** Tn916-induced mutants of *C. acetobutylicum* defective in regulation of solvent formation. *Arch. Microbiol.* **153**: 373-377
- Birnboim H. C. und J. Doly. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1522

- Blum H., H. Beyer und H. J. Gross. 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Böhringer M. 2002.** Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zur Regulation des Gens der Acetacetat-Decarboxylase von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm
- Bourret R. B., K. A. Borkovich und M. I. Simon. 1991.** Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 401-441
- Brinkmann U., R. E. Mattes und P. Buckel. 1989.** High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**: 109-114
- Brown D. P., L. Ganova-Raeva, B. D. Green, S. R. Wilkinson, M. Young und P. Youngman. 1994.** Characterization of *spo0A* homologues in diverse *Bacillus* and *Clostridium* species identifies a probable DNA-binding domain. *Mol. Microbiol.* **14**: 411-426
- Brüggemann H., S. Bäumer, W. F. Fricke, A. Wiezer, H. Liesegang, I. Decker, C. Herzberg, R. Martinez-Arias, R. Merkl, A. Henne und G. Gottschalk. 2003.** The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 1316-1321
- Brüggemann H. und G. Gottschalk. 2004.** Insights in metabolism and toxin production from the complete genome sequence of *Clostridium tetani*. *Anaerobe* **10**: 53-68
- Brun Y. V. und L. J. Shimkets. 2000.** Prokaryotic Development. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA
- Bunday Z., J. C. Linden und M. N. Karim. 1989.** Improved acetone-butanol fermentation analysis using subambient HPLC column temperature. *Enzyme Microbial Technol.* **12**: 24-27

- 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
- Burkholder W. F. und A. D. Grossman. 2000.** Regulation of the initiation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Prokaryotic Development. Brun Y. V. und L. J. Shimkets (Hrsg). S. 151-166. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA
- Chiao J.-S. und Z.-H. Sun. 2007.** History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: development of continuous production technology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 12-14
- Chibazakura T., F. Kawamura und H. Takahashi. 1991.** Differential regulation of *spo0A* transcription in *Bacillus subtilis*: glucose represses promoter switching at the initiation of sporulation. *J. Bacteriol.* **173**: 2625-2632
- Chibazakura T., F. Kawamura, K. Asai und H. Takahashi. 1995.** Effects of *spo0* mutations on *spo0A* promoter switching at the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**: 4520-4523
- 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
- Crooks G. E., G. Hon, J.-M. Chandonia und S. E. Brenner. 2004.** WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* **14**: 1188-1190
- Dartois V., T. Djavakhishvili und J. A. Hoch. 1996.** Identification of a membrane protein involved in activation of the KinB pathway to sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**: 1178-1186
- Del Tito B. J. Jr., J. M. Ward, J. Hodgson, C. J. Gershater, H. Edwards, L. A. Wysocki, F. A. Watson, G. Sathe und J. F. Kane. 1995.** Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 7086-7091

- Deutscher J., E. Küster, U. Bergstedt, V. Charrier und W. Hillen. 1995.** Protein kinase-dependent Hpr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 1049-1053
- Doß S., C. Gröger, T. Knauber, D. Whitworth und A. Treuner-Lange. 2005.** Comparative genomic analysis of signal transduction proteins in Clostridia. In: Handbook on Clostridia. Dürre P. (Hrsg). S. 561-583. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA
- 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
- Driks A. 1999.** *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 1-20
- Dubendorff J. W. und F. W. Studier. 1991.** Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with Lac repressor. *J. Mol. Biol.* **219**: 45-59
- 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. und H. Bahl. 1996.** Microbial production of acetone/butanol/isopropanol. In: Biotechnology. Roehr M. (Hrsg). Band 6. S. 230-268. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Dürre P. 1998.** New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 639-648
- 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

- Dürre P. und C. Hollergschwandner. 2004.** Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Anaerobe* **10**: 69-74
- Dürre P. 2005.** Formation of solvents in Clostridia. In: Handbook on Clostridia. Dürre P. (Hrsg). S. 673-695. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA
- Dürre P. 2007.** Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol. J.* **2**: 1525-1534
- Dürre P. 2008.** Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 353-362
- Dyer C. M. und F. W. Dahlquist. 2006.** Switched or not? The structure of unphosphorylated CheY bound to the N terminus of FliM. *J. Bacteriol.* **188**: 7354-7363
- Fabret C., V. A. Feher und J. A. Hoch. 1999.** Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**: 1975-1983
- Farabaugh P. J. 1978.** Sequence of the *lacI* gene. *Nature* **274**: 765-769
- Ferrari F. A., K. Trach, D. LeCoq, J. Spence, E. Ferrari und J. A. Hoch. 1985.** Characterization of the *spo0A* locus and its deduced product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2647-2651
- Feustel L. 2004.** Molekularbiologische Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *sol*-Operons von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm
- Feustel L., S. Nakotte und P. Dürre. 2004.** Characterization and development of two reporter gene systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 798-803
- Fond O., E. Petitdemange, H. Petitdemange und R. Gay. 1984.** Effect of glucose flow on the acetone-butanol fermentation in fed batch culture. *Biotechnol. Lett.* **6**: 13-18

- Frazier C. L., J. S. Filippo, A. M. Lambowitz und D. A. Mills. 2003.** Genetic manipulation of *Lactococcus lactis* by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1121-1128
- Fujita Y., Y. Miwa, A. Galinier und J. Deutscher. 1995.** Specific recognition of the *Bacillus subtilis gnt* cis-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol. Microbiol.* **17**: 953-960
- Gabriel C. L. 1928.** Butanol fermentation process. *Ind. Eng. Chem.* **20**: 1063-1067
- Galperin M. Y. 2006.** Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**: 4169-4182
- Gottschal 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
- Green B. D., G. Olmedo und P. Youngman. 1991.** A genetic analysis of Spo0A structure and function. *Res. Microbiol.* **142**: 825-830
- 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
- Grossmann A. D. und R. Losick. 1988.** Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4369-4373
- Grupe H. und G. Gottschalk. 1992.** Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3896-3902

- 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
- Hartmanis M. G. N. und S. Gatenbeck. 1984.** Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1277-1283
- Heap J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter und N. P. Minton. 2007.** The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* **70**: 452-464
- Hilbert D. W. und P. J. Piggot. 2004.** Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 234-262
- Ho S. N., H. D. Hunt, R. M. Morton, J. K. Pullen und L. R. Pease. 1989.** Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59
- Hoch J. A. 1993.** *spo0* genes, the phosphorelay, and the initiation of sporulation. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and genetics. Sonenshein A. L., J. A. Hoch und R. Losick (Hrsg). S. 747-755. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA
- Hollergschwandner C. G. 2003.** Unterschiede in der Regulation der Sporulation von *Clostridium acetobutylicum* und *Bacillus subtilis*. Dissertation, Universität Ulm
- Holt R. A., G. M. Stephens und J. G. Morris. 1984.** Production of solvents by *Clostridium acetobutylicum* cultures maintained at neutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1166-1170
- 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
- Ireton K. und A. D. Grossmann. 1992.** Coupling between gene expression and DNA synthesis early during development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8808-8812
- Ireton K., D. Z. Rudner, K. J. Siranosian und A. D. Grossmann. 1993.** Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Genes Dev.* **7**: 283-294
- Ireton K. und A. D. Grossmann. 1994.** A developmental checkpoint couples the initiation of sporulation to DNA replication in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **13**: 1566-1573
- Ireton K., S. Jin, A. D. Grossmann und A. L. Sonenshein. 1995.** Krebs cycle function is required for activation of the Spo0A transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2845-2849
- Jewell J. B., J. B. Coutinho und 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
- Jiang M., R. Grau und M. Perego. 2000a.** Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**: 303-310
- Jiang M., W. L. Shao, M. Perego und J. A. Hoch. 2000b.** Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **38**: 535-542
- Jones B. E., V. Dossonnet, E. Küster, W. Hillen, J. Deutscher und R. E. Klevit. 1997.** Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J. Biol. Chem.* **272**: 26530-26535
- Jones D. T., A. van der Westhuizen, S. Long, E. R. Allcock, S. J. Reid und D. R. Woods. 1982.** Solvent production and morphological changes in *C. acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1434-1439

- Jones D. T. und D. R. Woods. 1986.** Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiol. Rev. **50**: 484-524
- Jones D. T. 2001.** Applied acetone-butanol fermentation. In: Clostridia. Biotechnological and Medical Applications. Bahl H. und P. Dürre (Hrsg). S. 125-168. Wiley-VCH, Weinheim
- 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., J. T. Sullivan und D. T. Jones. 2001a.** Physical and genetic map of the *Clostridium saccharobutylicum* (formerly *Clostridium acetobutylicum*) NCP 262 chromosome. Microbiology **147**: 1909-1922
- Keis S., R. Shaheen und D. T. Jones. 2001b.** 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
- Kellmann J. W., E. Piechersky und B. Piechulla. 1990.** Analysis of the diurnal expression patterns of the tomato chlorophyll a/b binding protein genes. Influence of light and characterization of the gene family. Phytobiol. **52**: 35-41
- Kern D., B. F. Volkman, P. Luginbuhl, M. J. Nohaile, S. Kustu und D. E. Wemmer. 1999.** Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. Nature **402**: 894-898
- Kunst F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. Dusterhoft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S. Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A.**

- Henaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M. F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S. M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauel, C. Medigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S. H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B. S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Rognoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandenbol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H. F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa und A. Danchin. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature **390**: 249-256
- Labbe R. G. 2005. Sporulation (Morphology) of the Clostridia. In: Handbook on Clostridia. Dürre P. (Hrsg). S. 647-658. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685
- LeDeaux J. R. und A. D. Grossman. 1995. Isolation and characterization of *kinC*, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **177**: 166-175
- LeDeaux J. R., N. Yu und A. D. Grossman. 1995. Different roles for KinA, KinB and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **177**: 861-863
- Lee S. F., C. W. Forsberg und L. N. Gibbins. 1985. Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol. **50**: 1068-1076

- Lee S. Y., H. S. Cho, J. G. Pelton, D. Yan, E. A. Berry und D. E. Wemmer. 2001.** Crystal structure of activated CheY. Comparison with other activated receiver domains. *J. Biol. Chem.* **276**: 16425-16431
- Lemmel S. A., R. Datta und J. R. Frankiewicz. 1986.** Fermentation of xylan by *Clostridium acetobutylicum*. *Enzyme Microbial Technol.* **8**: 217-221
- Levin R. und R. W. Brauer. 1951.** The biuret reaction for the determination of proteins; an improved reagent and its application. *J. Lab. Clin. Med.* **38**: 474-480
- Lewis R. J., J. A. Brannigan, K. Muchova, I. Barak und A. J. Wilkinson. 1999.** Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein. *J. Mol. Biol.* **294**: 9-15
- Long S., D. T. Jones und D. R. Woods. 1984a.** The relationship between sporulation and solvent production in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Biotechnol. Lett.* **6**: 529-534
- Long S., D. T. Jones und D. R. Woods. 1984b.** Initiation of solvent production, clostridial stage, and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 256-261
- Losick R. und P. Stragier. 1992.** Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Nature* **355**: 601-604
- Lukat G. S., W. R. McCleary, A. M. Stock und J. B. Stock. 1992.** Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 718-722
- Maddox I. S. 1980.** Production of n-butanol from whey filtrate using *Clostridium acetobutylicum* NCIB 2951. *Biotechnol. Lett.* **2**: 493-498
- Madigan M. T., J. M. Martinko und J. Parker. 2000.** Brock biology of microorganisms. 1. Nachdruck 2002. Spectrum, Akad. Verl., Berlin

- Marahiel M. A., M. M. Nakano und P. Zuber. 1993.** Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **7**: 631-636
- 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
- McCoy E., E. B. Fred, W. H. Peterson und E. G. Hastings. 1926.** A cultural study of the avetone butyl alcohol organism. *J. Infect. Dis.* **39**: 457-483
- 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. *Bio/Technol.* **10**: 190-195
- Mermelstein L. D. und E. T. Papoutsakis. 1993.** *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage Φ 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1077-1081
- Minton N. P., M. L. Mauchline, M. J. Lemmon, J. K. Brehm, M. Fox, N. P. Michael, A. Giaccia und J. M. Brown. 1995.** Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 357-364
- Minton N. P. 2003.** Clostridia in cancer therapy. *Nature Rev. Microbiol.* **1**: 237-242
- Molle V., Y. Nakaura, R. P. Shivers, H. Yamaguchi, R. Losick, Y. Fujita und A. L. Sonenshein. 2003.** Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J. Bacteriol.* **185**: 1911-1922
- Moran C. P. J. 1993.** RNA polymerase and transcription factors. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria. Sonenshein A. L., J. A. Hoch und R. Losick (Hrsg). S. 653-667. American Society for Microbiology, Washington, DC

- Muchova K., R. J. Lewis, J. A. Brannigan, W. A. Offen, D. P. Brown, I. Barak, P. Youngman und A. J. Wilkinson. 1999.** Crystallization of the regulatory and effector domains of the key sporulation response regulator Spo0A. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **55**: 671-676
- Nixon B. T., C. W. Ronson und F. M. Ausubel. 1986.** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7850-7854
- 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
- O'Brien R. W. und J. G. Morris. 1971.** The ferredoxin-dependent reduction of chloramphenicol by *Clostridium acetobutylicum*. *J. Gen. Microbiol.* **67**: 265-271
- Oelmüller U., N. Krüger, A. Steinbüchel und C. G. Friedrich. 1990.** Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Methods* **11**: 73-84
- Ohlsen K. L., J. K. Grimsley und J. A. Hoch. 1994.** Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1756-1760
- Oultram J. D., M. Loughlin, T.-J. Swinfeld, 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

- Paredes C. J., K. V. Alsaker und E. T. Papoutsakis. 2005.** A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 969-978
- Pasteur L. 1861a.** Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **52**: 344-347
- Pasteur L. 1861b.** Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **52**: 1260-1264
- Pasteur L. 1862.** Quelques résultats nouveaux relatifs aux fermentations acétique et butyrique. *Bull. Soc. Chim. Paris.* 52-53
- Perego M., S. P. Cole, D. Burbulys, K. Trach und J. A. Hoch. 1989.** Characterization of the gene for a protein kinase which phosphorylates the sporulation-regulatory proteins Spo0A and Spo0F of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **171**: 6187-6196
- Perego M. 1997.** A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8612-8617
- Perego M. 2001.** A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **42**: 133-143
- Perego M. und J. A. Hoch. 2002.** Two-component systems, phosphorelays, and regulation of their activities by phosphatases. In: *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Sonenshein A. L., J. A. Hoch und R. Losick (Hrsg). S. 473-481. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA
- Phillips Z. E. und M. A. Strauch. 2002.** *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 392-402
- Piggot P. J. und R. Losick. 2002.** Sporulation genes and intercompartmental regulation. In: *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Sonenshein A. L., J. A. Hoch und R. Losick (Hrsg). S. 483-518. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA

- Predich M. G. Nair und I. Smith. 1992.** *Bacillus subtilis* early sporulation genes *kinA*, *spo0F*, and *spo0A* are transcribed by the RNA polymerase containing sigma H. J. Bacteriol. **174**: 2771-2778
- Quisel J. D. und A. D. Grossman. 2000.** Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB). J. Bacteriol. **182**: 3446-3451
- Quisel J. D., W. F. Burkholder und A. D. Grossman. 2001.** *In vivo* effects of sporulation kinases on mutant Spo0A proteins in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **183**: 6573-6578
- Ratnayake-Lecamwasam M., P. Serror, K. W. Wong und A. L. Sonenshein. 2001.** *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. Genes Dev. **15**: 1093-1103
- Ravagnani A., K. C. B. Jennert, E. Steiner, R. Grünberg, 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
- Reysenbach A. L., N. Ravenscroft, S. Long, D. T. Jones und D. R. Woods. 1986.** Characterization, biosynthesis, and regulation of granulose in *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol. **52**: 185-190
- Rosenberg A. H., E. Goldman, J. J. Dunn, F. W. Studier und G. Zubay. 1993.** Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. J. Bacteriol. **175**: 716-722
- Rowland S. L., W. F. Burkholder, K. A. Cunningham, M. W. Maciejewski, A. D. Grossman und G. F. King. 2004.** Structure and mechanism of action of Sda, an inhibitor of the histidine kinases that regulate initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. Molecular Cell **13**: 689-701

- Saiki R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim. 1985.** Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Saluz H. und J. P. Jost. 1989.** A simple high-resolution procedure to study DNA methylation and *in vivo* DNA-protein interactions on a single-copy gene level in higher eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2602-2606
- Sambrook J., D. W. Russell, N. Irwin und K. A. Janssen. 2001.** Molecular cloning. A laboratory manual. 3. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Sanger F., S. Nickler und A. R. Coulson. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Santangelo J. D. und P. Dürre. 1996.** Microbial production of acetone and butanol: can history be repeated? *CHIMICA OGGI/chemistry today* **14**: 29-35
- Santangelo J. D., A. Kuhn, A. Treuner-Lange und P. Dürre. 1998.** Sporulation and time course expression of sigma-factor homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 157-164
- Satola S., P. A. Kirchman und C. P. Jr. Moran. 1991.** Spo0A binds to a promoter used by sigma A RNA polymerase during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4533-4537
- Satola S. W., J. M. Baldus und C. P. Jr. Moran. 1992.** Binding of Spo0A stimulates *spoIIIG* promoter activity in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**: 1448-1453
- Sauer U., A. Treuner, M. Buchholz, J. D. Santangelo und P. Dürre. 1994.** Sporulation and primary sigma factor homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **176**: 6572-6582
- Sauer U., J. D. Santangelo, A. Treuner, M. Buchholz und P. Dürre. 1995.** Sigma factor and sporulation genes in *Clostridium*. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 331-340

- 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
- Schaller B. D. 2007.** Charakterisierung von Virulenzregulatoren und Virulenzfaktoren aus *Streptococcus agalactiae*. Dissertation, Universität Ulm
- Schardinger F. 1904.** Acetongärung. Wiener Klin. Wochenschr. **17**: 207-209
- Schardinger F. 1905.** *Bacillus macerans*, ein Aceton bildender *Rottebacillus*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II **14**: 772-781
- Schmitt J., H. Hess und H. G. Stunneberg. 1993.** Affinity purification of histidine-tagged proteins. Mol. Biol. Rep. **18**: 223-230
- Schneider T. D. und R. M. Stephens. 1990.** Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucl. Acid. Res. **18**: 6097-6100
- Schwarz C. 2005.** Etablierung eines induzierbaren Systems in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm
- Scotcher M. C., F. B. Rudolph und G. N. Bennett. 2005.** Expression of *abrB310* and *sinR*, and effects of decreased *abrB310* expression on the transition from acidogenesis to solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 1987–1995
- Sebaihia M., B. W. Wren, P. Mullany, N. F. Fairweather, N. P. Minton, R. Stabler, N. R. Thomson, A. P. Roberts, A. M. Cerdeno-Tarraga, H. Wang, M. T. Holden, A. Wright, C. Churcher, M. A. Quail, S. Baker, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, A. Cronin, P. Davis, L. Dowd, A. Fraser, T. Feltwell, Z. Hance, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, L. Unwin, S. Whithead, B. Dupuy, G. Dougan, B. Barrell und J. Parkhill. 2006.** The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. Nat. Genet. **38**: 779-786

- Sebaihia M., M. W. Peck, N. P. Minton, N. R. Thomson, M. T. G. Holden, W. J. Mitchell, A. T. Carter, S. D. Bentley, D. R. Mason, L. Crossman, C. J. Paul, A. Ivens, M. H. J. Wells-Bennik, I. J. Davis, A. M. Cerdeno-Tarraga, C. Churcher, M. A. Quail, T. Chillingworth, T. Feltwell, A. Fraser, I. Goodhead, Z. Hance, K. Jagels, N. Larke, M. Maddison, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, E. Rabbino-witsch, M. Sanders, M. Simmonds, B. White, S. Whithead und J. Parkhill. 2007.** Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome Res.* **17**:1082-1092
- Seidel H. M., D. L. Pompliano und J. R. Knowles. 1992.** Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from *Tetrahymena pyriformis* and overexpression of the gene product in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**: 2598-2608
- Shimizu T., K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, A. Yamashita, T. Shiba, N. Ogasawara, M. Hattori, S. Kuhara und H. Hayashi. 2002.** Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 996-1001
- Shimkets L. J. und Y. V. Brun. 2000.** Procaryotic development: strategies to enhance survival. In: *Prokaryotic Development*. Brun Y. V. und L. J. Shimkets (Hrsg). S. 1-7. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA
- Smith P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85 (Erratum *Anal. Biochem.* 163: 279; 1985)
- Spiegelman G. B., T. H. Bird und V. Voon. 1995.** Transcription regulation by the *Bacillus subtilis* response regulator Spo0A. In: *Two-component signal transduction*. Hoch J. A. und T. J. Silhavy (Hrsg). S. 159-179. American Society for Microbiology, Washington D. C., USA
- Stephenson K. und J. A. Hoch. 2002.** Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Mol. Microbiol.* **46**: 297-304

- Stephenson K. und R. J. Lewis. 2005.** Molecular insights into the initiation of sporulation in Gram-positive bacteria: new technologies for an old phenomenon. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 281-301
- Stock A., D. E. Koshland und J. Stock. 1985.** Homologies between the *Salmonella typhimurium* CheY protein and proteins involved in the regulation of chemotaxis, membrane protein synthesis, and sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7989-7993
- 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
- Stock A. M., V. L. Robinson und P. N. Goudreau. 2000.** Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 183-215
- Stock A. M. und J. Guhaniyogi. 2006.** A new perspective on response regulator activation. *J. Bacteriol.* **188**: 7328-7330
- Stover A. G. und A. Driks. 1999.** Control of synthesis and secretion of the *Bacillus subtilis* protein YqxM. *J. Bacteriol.* **181**: 7065-7069
- Stragier P. und R. Losick. 1990.** Cascades of sigma factors revisited. *Mol. Microbiol.* **4**: 1801-1806
- Stragier P. und R. Losick. 1996.** Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 297-241
- Stragier P. 2002.** A gene odyssey: exploring the genomes of endospore-forming bacteria. In: *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Sonenshein A. L., J. A. Hoch und R. Losick (Hrsg). S. 519-525. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA
- Strauch M. A., M. Perego, D. Burbulys und J. A. Hoch. 1989.** The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth. *Mol. Microbiol.* **3**: 1203-1209

- Strauch M., V. Webb, G. Spiegelman und J. A. Hoch. 1990.** The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 1801-1805
- Strauch M. A., K. A. Trach, J. Day und J. A. Hoch. 1992.** Spo0A activates and represses its own synthesis by binding at its dual promoters. Biochimie **74**: 619-626
- Strauch M. A. und J. A. Hoch. 1993.** Transition state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. Mol. Microbiol. **7**: 337-342
- Strauch M. A., J. J. Wu, R. H. Jonas und J. A. Hoch. 1993.** A positive feedback loop controls transcription of the *spo0F* gene, a component of the sporulation phosphorelay in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **7**: 967-974
- Strauch M. A. 1995.** Delineation of AbrB-binding sites on the *Bacillus subtilis* *spo0H*, *kinB*, *ftsAZ* and *pbpE* promoters and use of a derived homology to identify a previously unsuspected binding site in the *bsuBI* methylase promoter. J. Bacteriol. **177**: 6999-7002
- Studier F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn und J. W. Dubendorff. 1990.** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. **185**: 60-89
- Sutcliffe J. G. 1979.** Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Symp. Quant. Biol. **43**: 77-90
- Terraciano J. S. und E. R. Kashket. 1986.** Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol. **52**: 86-91
- 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

- Tomas C. A., K. V. Alsaker, H. P. J. Bonarius, W. T. Hendriksen, H. Yang, J. A. Beamish, C. J. Paredes und E. T. Papoutsakis. 2003.** DNA array-based transcriptional analysis of asporogenous, non solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains SKO1 and M5. J. Bacteriol. **185**: 4539–4547
- Towbin H., T. Staehelin, J. Gordon. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4355
- Trach K. A., J. W. Chapman, P. J. Piggot und J. A. Hoch. 1985.** Deduced product of the stage 0 sporulation gene *spo0F* shares homology with the Spo0A, OmpR, and SfrA proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 7260-7264
- Trach K., D. Burbulys, M. Strauch, J. J. Wu, N. Dhillon, R. Jonas, C. Hanstein, P. Kallio, M. Perego, T. Bird, G. Spiegelman, C. Fogher und J. A. Hoch. 1991.** Control of the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* by a phosphorelay. Res. Microbiol. **142**: 815-823
- Trach K. A. und J. A. Hoch. 1993.** Multisensory activation of the phosphorelay initiating sporulation in *Bacillus subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway. Mol. Microbiol. **8**: 69-79
- 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
- Vieira J. und J. Messing. 1982.** The pUC plasmids, an M13-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**: 259-268
- Volz K. 1993.** Structural conservation in the CheY superfamily. Biochemistry **32**: 11741-11753
- Wallace D. M. 1987.** Large- and small-scale phenol extractions. Methods Enzymol. **152**: 33-41

- Walter K. A., R. V. Nair, J. W. Caryb, G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis. 1993.** Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **134**: 107-111
- West A. H. und A. M. Stock. 2001.** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem.* **26**: 369-376
- Whittenbury R., S. L. Davies und S. L. Davey. 1970.** Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 219-232
- 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
- Wolfe A. J. 2005.** The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 12-50
- Wong J. und G. N. Bennett. 1996.** Recombination-induced variants of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 with increased solvent production. *Curr. Microbiol.* **32**: 349-356
- Woods D. R. und D. T. Jones. 1986.** Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors. *Adv. Microb. Physiol.* **28**: 1-64
- Woolley R. C. und J. G. Morris. 1990.** Stability of solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture: strain differences. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 718-728
- Wu J. J., P. J. Piggot, K. M. Tatti und C. P. Moran, Jr. 1991.** Transcription of the *Bacillus subtilis spoIIA* locus. *Gene* **101**: 113-116
- Young M., N. P. Minton und W. L. Staudenbauer. 1989.** Recent advances in the genetics of the clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**: 301-326
- Yu E. K. C., L. Deschatelets und J. N. Saddler. 1984.** The bioconversion of wood hydrolysates to butanol and butanediol. *Biotechnol. Lett.* **6**: 327-332

- Zhao Y., C. A. Tomas, F. B. Rudolph, E. T. Papoutsakis und G. N. Bennett. 2005.** Intracellular butyryl phosphate and acetyl phosphate concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and their implications for solvent formation. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 530-537
- Zheng G., L. Z. Yan, J. C. Vederas und P. Zuber. 1999.** Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriosin subtilisin. J. Bacteriol. **181**: 7346-7355
- Zhong J., M. Karberg und A. M. Lambowitz. 2003.** Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. Nucl. Acid Res. **31**: 1656-1664
- Zuber P. und R. Losick. 1987.** Role of AbrB in Spo0A- and Spo0B-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **169**: 2223-2230
- Zuker M. 2003.** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucl. Acids Res. **31**: 3406-3415
- Zverlov V. V., O. Berezina, G. A. Velikodvorskaya und W. H. Schwarz. 2006.** Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. Appl. Microbiol. Biotechnol. **71**: 587-597

7 Anhang

Potentielle AbrB-Bindestellen im *spo0A*-Promoterbereich von *C. sporogenes* NCIMB10696, *C. beijerinckii* NCIMB8052, *C. thermocellum* ATCC 27405, *C. phytofermentans* ISDg, *C. tetani* E88, *C. perfringens* ATCC 13124, *C. difficile* 630, *C. botulinum* A str. ATCC 19397 und *C. novyi* NT. Dargestellt ist ein Bereich von ca. 50-60 Bp vor der 0A-Box bis zum jeweiligen Startkodon von *spo0A*. Die jeweilige putative 0A-Box ist eingekreist und die potentiellen Erkennungssequenzen für das AbrB-Protein sind mit grünen Kästchen angezeigt. Der Translationsstartpunkt von *spo0A* ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

C. sporogenes NCIMB10696

```

5' -TTATATATTTTT[CTCAAATA]AGGAGGAATTGAATTCCTTTGTCGAATAAATAATTTGT
3' -AATATATAAAAAAGAGTTTATTCCTCCTTAACTTAA[GAAAACAG]CTTATTTATTAAACA

                                     ▶
TAAGATATGGTAATTTTAT[CAAAAAGG]AGAGTAGTTTATATG-3'
ATTCTATACCATTAATAAGTTTTCCTCTCATCAAATATAC-5'

```

C. beijerinckii NCIMB8052

```

5' -TAATATATTGTGTTATATTGTACAATGATGGAACATTTAATAAGATATGGTTATAGGGG
3' -ATTA[TATAACAC]AATATAACATGTTACTACCTTGATAAATTATTCTATACCAATATCCCC

                                     ▶
TTAATAATATATATTAATAACAAACATAATAAAGAATGGACAAAAGGAGAGAAAAAATATG-3'
AATTTATTATATAATTTTATGTTTGTATTATTTTCTTACCTGTTTTCTCTTTTTTATAC-5'

```

C. thermocellum ATCC 27405

```

5' -ACAAGTTATATAAAGAGTAATTTCAATACCCAGTATATTGAAATTTGTCGAATAGACAAT
3' -TGTTCAATATATTTCTCATTAAGTAATGGGTCATATAACTTTAAACAGCTTATCTGTTA

                                     ▶
ATAATAATGGTATAAATTAAGTAGCAGTCTTTA[CAAAAAT]TAAGGGGGAGTCAATTTG-3'
TATTATTACCATATTTAATTGATCGTCAGAAAATGTTTTTAATCCCCCTCAGTTAAAC-5'

```

C. phytofermentans ISDg

```

5' -ATATTATGTAAGGTAGATAGTGT[CATAAAAG]GTAAGAAAAATATGAAAGGAATTGGG
3' -TATAATACATTCCATCTATCACAGTATTTTCCATTCTTTTATACTTTCCTTAACCC

                                     ▶
CCCCTTTCATTATAACACTTCTCGTATGATATCGGAAGGAAAAGAATATTAGGAGGTTTCGTAATG-3'
GGGGAAAGTAATATTGTGAAGAGCATACTATAGCCTTCCTTTCTTATAATCCTCCAAAGCATTAC-5'

```

C. tetani E88

5' -CTTTTATCCTAATAATGTAAAAATTTCTTAAAT**TAAAAAGG**ATTAACTTGTTT**0A-Box**TGTCGAA
3' -**GAAAAATAG**GATTATTACATTTTTTTAAAGAATTTATTTTTCCTAAATTGAA

ATAGTTAGTTGTTAGGATATGGAATAATTTTGTG-3'
TATCAATCAACAATCCTATACCTTAT**TAAAAACAC**-5'

C. perfringens ATCC 13124

5' -TAAATGAATTTTTTAGTATTTATTTTTTTTAGAAGGAAATAAATAAGTTT**0A-Box**TGTCGAATAT
3' -ATTACTT**AAAAAATC**ATAAATA**AAAAAATC**TTCCCTTATTTATTCAAACAGCTTATA

AGTTAAAGTAGAATAATTGTAAAAAATGGATATATAAAGTTGGTTAAGGAGAGAAAAGCATG-3'
TCAATTCATCTTATTAACATTTTTTTACCTATATATTCAACCAATTCCTCTCTTTTCGTAC-5'

C. difficile 630

5' -AAAAAATTTTATTATTTTATCAATTATCTAGGAGGAATATAATTTTGGAGT**0A-Box**TGTCGAATATGCTTTAG
3' -TTTTTTAAATAATAAAATAGTTAATAGATCCTCCTTATA**TTAAAACC**TCACAGCTTATA

AGTAGATAATTAGGAAGCAATTGTGTAAAAAGTTTAGTTTTCTGTAATAAGAAGATGTTTTTTAATG-3'
TCATCTATTAATCCTTCGTTAACACATTTTTTCAAAT**CAAAAAGAC**ATTATTCTCTACAAAAAATTAC-5'

C. botulinum A str. ATCC 19397

5' -TATCTTACACTTTATTATTTTTTATATATTTTT**CTCAAATA**AGGAGGAATTAAATTTCTTT**0A-Box**TGTCGAA
3' -ATAGAATGTGAAATAATAAAAAATATATAAAAAAGAGTTTATTCCTCCTTAATTTAA**GAAAACAG**CTT

TAAATAATTTGTTAAGATATGGTAATTTTAT**CAAAAAGG**AGAGTAGTTTATATG-3'
ATTTATTAAACAATTCTATACCATTAATAAGTTTTCCTCTCATCAAATATAC-5'

C. novyi NT

5' -TTTTAAAAAATTATCCTGGTTTTAGTAAATTTTTGGAAAAATAGAAGATTATCGTGGTTTT**0A-Box**TGTCGAA
3' -AAAATTTTTTAATAGGACCAAATCAT**TTAAAAAC**CTTTATCTTCCTAAATAGCACCAAAACAGCTT

ATAGTAATTTGTTAAGAAATGGAA**CAAAAAGA**ATAAGGGGATAAAAAATTTATG-3'
TATCATTAACAATTCTTTACCTTGTTTTCTTATTCCCTATTT**TTAAATAC**-5'

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie die diesen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Ulm, den

Stephanie Würfl