

Stammdesign in *B. licheniformis*

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen
Doktorgrades "Doctor rerum naturalium"
der Georg-August-Universität
Göttingen

vorgelegt von
Michael Rachinger
aus Gunzenhausen

Göttingen 2010

D7

Referent: PD. Dr. R. Daniel

Koreferent: Prof. em. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	1
1.2. Methoden für den DNA-Transfer.....	2
1.3. Restriktions-Modifikations-Systeme	4
1.4. Mutagenese.....	6
1.5. Ziele der Arbeit.....	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Organismen und Plasmide.....	9
2.2. Nährmedien	10
2.2.1. Nährmedien für <i>E. coli</i>	11
2.2.2. Nährmedien für <i>Bacillus</i>	11
2.3. Zellanzucht	13
2.4. Stammhaltung	13
2.5. Reinheitskontrollen.....	13
2.6. Bestimmung der optischen Dichte	14
2.7. Anreicherung von Phagenpartikel.....	14
2.8. Elektronenmikroskopie	14
2.9. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	15
2.9.1. Vorbereiten von Geräten und Lösungen für das molekulargenetische Arbeiten.....	15
2.9.2. Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA.....	15
2.9.3. Isolierung von Plasmid-DNA.....	15
2.9.4. Isolierung von genomischer DNA	16
2.9.5. Agarose-Gelelektrophorese	16
2.9.5.1. Analytische Gelelektrophorese.....	16
2.9.5.2. Präparative Gelelektrophorese.....	17
2.9.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	18
2.9.7. DNA-Gelextraktion.....	18
2.9.8. Scheren von DNA.....	18
2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.10.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten	19
2.10.2. "Splicing with overlap extensions" (SOE)- PCR	20

2.11.	Enzymatische Modifikation von DNA.....	22
2.11.1.	Restriktionsverdau.....	22
2.11.2.	Dephosphorylierung.....	23
2.11.3.	Erstellen von glatten Enden ("Blunt Ends").....	23
2.11.4.	Erstellen von 3'-Adenosinüberhängen.....	24
2.11.5.	Ligation.....	25
2.12.	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	25
2.12.1.	Klonierung durch Restriktion und Ligation.....	25
2.12.2.	Klonierung durch Hybridisierung.....	26
2.12.3.	TOPO -Klonierung.....	27
2.12.4.	Erstellen von Fosmid-Banken.....	28
2.13.	DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Analyse).....	29
2.13.1.	Markierung der DNA-Sonden.....	29
2.13.2.	Restriktionsverdau und Auftrennung der DNA.....	29
2.13.3.	DNA-Transfer auf Nylonmembran.....	29
2.13.4.	Hybridisierung der Sonde.....	31
2.13.5.	Kolorimetrische Detektion der Sonde.....	32
2.14.	DNA-Transfer in <i>E. coli</i> und Vertreter der Gattung <i>Bacillus</i>	33
2.14.1.	Herstellung und Verwendung chemisch-kompetenter Zellen.....	33
2.14.2.	Elektroporation.....	33
2.14.2.1.	Elektroporation in <i>E. coli</i>	33
2.14.2.2.	Elektroporation in <i>Bacillus</i>	34
2.14.3.	Konjugation.....	36
2.15.	Transposonmutagenese.....	36
2.16.	Erzeugen von Deletionen in <i>B. licheniformis</i>	37
2.17.	Erstellen von Insertionen in <i>B. licheniformis</i>	40
2.18.	Sequenzierung.....	40
2.18.1.	Sequenzanalyse nach Sanger, et al., 1992.....	40
2.18.2.	454-Sequenzierung.....	41
2.19.	Lückenschluss.....	41
2.20.	Qualitätsverbesserung.....	42
2.21.	Annotation.....	43
2.21.1.	ORF-Vorhersage.....	43
2.21.2.	BiBaG.....	43

2.21.3.	Identifizierung von Fremdgenen.....	44
2.21.4.	Manuelle Annotation	44
3.	Ergebnisse	46
3.1.	DNA-Transfer in <i>B. licheniformis</i>	46
3.1.1.	Etablierung eines Elektroporationsprotokolls für <i>B. licheniformis</i> MW3.....	46
3.1.2.	Vektoren für die Konjugation	48
3.1.3.	<i>in vivo</i> -Methylierung	54
3.2.	Markerfreie Deletion in <i>B. licheniformis</i>	62
3.2.1.	Deletion des PBSX-orthologen Phagen in <i>B. licheniformis</i> MW3	62
3.2.2.	Gendeletion in <i>B. licheniformis</i> H1	69
3.3.	Markerfreie Insertion in <i>B. licheniformis</i> MW3	72
3.4.	Das Genom von <i>B. licheniformis</i> 9945A	78
3.4.1.	Sequenzierung, Lückenschluss und Annotation.....	78
3.4.2.	Allgemeine Eigenschaften des Genoms	79
3.4.3.	Vergleich <i>B. licheniformis</i> 9945A mit Vertretern der Gattung <i>Bacillus</i>	82
3.4.4.	Identifizierung von Fremdgenen und Prophagen	83
3.4.5.	Regulation der natürlichen Kompetenz.....	84
3.4.6.	Restriktion und Modifikation.....	85
3.4.7.	Aerobes und anaerobes Wachstum	86
3.4.8.	Harnstoffverwertung.....	87
3.4.9.	Xylan-Abbau	88
3.4.10.	Nitrat-Reduktion.....	89
3.4.11.	Antibiotika und sekundäre Metabolite	92
4.	Diskussion.....	96
4.1.	DNA-Transfer in <i>B. licheniformis</i>	96
4.1.1.	Elektroporation in <i>B. licheniformis</i>	96
4.1.2.	Konjugation in Vertreter der Gattung <i>Bacillus</i>	97
4.1.3.	<i>in vivo</i> -Methylierung	99
4.2.	Mutagenese in <i>B. licheniformis</i>	103
4.2.1.	Markerfreie Deletion in <i>B. licheniformis</i>	105
4.2.2.	Markerfreie Insertion in <i>B. licheniformis</i>	107
4.3.	Analyse des Genoms von <i>B. licheniformis</i> 9945A.....	109
4.3.1.	Allgemeine Eigenschaften des Genoms	112
4.3.2.	Physiologische Eigenschaften.....	113

4.3.3.	Anaerobes Wachstum.....	114
4.3.4.	Antibiotika und sekundäre Metabolite	114
4.3.5.	Ausblick.....	117
5.	Zusammenfassung	119
6.	Literaturverzeichnis.....	121
7.	Anhang	138
	Danksagung	143
	Lebenslauf.....	145

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	bis auf angegebenes Volumen auffüllen
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methionin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	"American Type Culture Collection"
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP-T	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, p-Toluidine Salz
BGSC	" <i>Bacillus</i> Genetic Stock Center"
BiBaG	"Bidirectional blast for identification of Bacterial pan and core Genomes"
bidest.	bidestilliert
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CDS	kodierende Sequenz ("coding sequence")
Chl	Chloramphenicol
(bi)dest.	(zweifach) destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und weitere (<i>et alii</i>)
F	Farad
Fa.	Firma
g	Gramm
Gap	" <i>genome assembly program</i> "
h	Stunde
inHg	Inch Quecksilbersäule
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin

k	Kilo (10^3)
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
LacZ	β -Galaktosidase
LB	Luria Bertani
m	milli- (10^{-3})/Meter
M	Molar (mol/l), Mega- (10^6)
μ	Mikro- (10^{-6}), Wachstumsrate
MCS	Multiklonierungsstelle ("multiple cloning site")
min	Minute
n	Nano- (10^{-9})
NB	Nährbouillon
NRPS	Nicht-Ribosomale-Peptid-Synthetase
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ("open reading frame")
oriR	Replikationsursprung ("origin of replication")
oriT	Transferursprung ("origin of transfer")
PCR	Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKS	Polyketid-Synthetase
r	resistent/Resistenz
RM	Restriktion-Modifikation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur/
sek	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spurenelementlösung
SOE	"Splicing with overlap extensions"
sp.	Spezies
SSC	"Saline Sodium Citrate"
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TE	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur ("melting temperature")
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Einheit der Enzymaktivität ("unit")
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid

Nukleotidbasen

A	Purinbase Adenin	G	Purinbase Guanin
C	Pyrimidinbase Cytosin	T	Pyrimidinbase Thymin
W	Adenin oder Thymin	S	Guanin oder Cytosin

Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1. Einleitung

Bacillus Spezies sind die am häufigsten verwendeten Organismen für die Enzymproduktion in der angewandten und industriellen Mikrobiologie (Schallmey, et al., 2004). Darüber hinaus stellen sie eine wichtige Quelle extrazellulärer Enzyme für industrielle Anwendungen dar. Diese Organismen zeichnen sich durch ihre hohen Wachstumsraten, ihre Fähigkeit Proteine an das Medium abzugeben, und nicht zuletzt durch den hohen Grad an Wissen über ihre Biochemie, Physiologie und Genetik aus. *Bacilli* sind aufgrund ihrer Fähigkeit große Mengen an Exoenzymen (bis 25 g/l) zu produzieren von hohem biotechnologischem Interesse (Schallmey, et al., 2004). Insgesamt werden durch Vertreter der Gattung *Bacillus* eine Vielzahl an Enzymen produziert, unter anderen alkalische Proteasen, Amylasen, Pullulanasen, Pektat-Lyasen und β -Glukanasen, die in der Reinigungsmittel-, Stärke-, Textil-, Back- und Getränkeindustrie verwendet werden (Schallmey, et al., 2004). Des Weiteren werden Antibiotika, wie Bacitracin und Surfactin, und Hormone, wie z.B. Interferone und Proinsulin, von *Bacilli* synthetisiert (Schallmey, et al., 2004). Einen wichtigen Produktionsorganismus innerhalb der Gattung *Bacillus* stellt *Bacillus licheniformis* dar.

1.1. *Bacillus licheniformis*

B. licheniformis ist ein weit verbreitetes Gram-positives Bodenbakterium (Vos, 2009). Der Organismus kann aus Böden und abgestorbenem Pflanzenmaterial isoliert werden. *B. licheniformis* kann sowohl anaerob als auch aerob bis zu einer maximalen Temperatur von 55 °C wachsen. Der Temperaturbereich für optimales Wachstum liegt zwischen 32 °C und 45 °C.

Innerhalb der Spezies *B. licheniformis* wurde bereits der Typ-Stamm *Bacillus licheniformis* DSM13 sequenziert (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004). Dieser besitzt ein 4.222.645 bp großes Chromosom mit einem GC-Gehalt von 46,2 Mol%. Die Zahl der identifizierten Gene lag bei 4.286. Im Genom konnten darüber hinaus sieben rRNA-Cluster und 72 tRNAs entdeckt werden. Die Spezies ist fähig aerob auf Zuckern zu wachsen. Es wurden die Gene für die Glykolyse, den Pentosephosphat-Zyklus und den TCA-Zyklus identifiziert. Des Weiteren besitzt *B. licheniformis* DSM13 Gene für den Glyoxylat-Bypass, den *Bacillus subtilis* 168

im Vergleich dazu nicht aufweist (Barbe, et al., 2009, Kunst, et al., 1997). Dieser Stoffwechselweg ermöglicht *B. licheniformis* DSM13 ein Wachstum auf C2-Substraten, wie beispielsweise Acetat. *B. licheniformis* DSM13 besitzt die Fähigkeit alle proteinogenen Aminosäuren (AS) und Vitamine für ein Wachstum auf Minimalmedium mit Glukose selbst zu synthetisieren (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004). Darüber hinaus ist *B. licheniformis* DSM13 imstande anaerob auf Glukose zu wachsen (Veith, et al., 2004). Insbesondere eine anaerobe Ribonukleotid-Reduktase und eine dissimilatorische Nitrat-Reduktase konnten in diesem Zusammenhang identifiziert werden. *B. licheniformis* DSM13 besitzt nicht die Gene für eine vollständige Denitrifikation, obwohl einige Vertreter der Spezies *B. licheniformis* als Denitrifikanten beschrieben worden sind (Pichinoty, et al., 1978, Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004). Dies legt die Vermutung nahe, dass Denitrifikation keine allgemeine Eigenschaft innerhalb der Spezies *B. licheniformis* ist.

Im Genom von *B. licheniformis* DSM13 konnte ein Gencluster für die Biosynthese von Nicht-Ribosomalen Peptiden (NRP) identifiziert werden (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004). Gencluster für die Synthese von Polyketiden (PK) wurden jedoch nicht entdeckt. Im Vergleich dazu besitzt *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, ein Verwandter von *B. licheniformis*, neun Gencluster für die NRP- und PK-Biosynthese (Chen, et al., 2007, Chen, et al., 2009). Diese belegen 8,5 % des gesamten Genoms. Im Genom von *B. licheniformis* DSM13 konnten zwei *Typl*-RM-Systeme identifiziert werden. Waschkau, et al., 2008 erzeugten durch Deletion der Restriktionsuntereinheiten die restriktionsdefiziente Mutante *B. licheniformis* MW3. Sie konnten zeigen, dass eine deutlich gesteigerte Transformationseffizienz im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar war.

1.2. Methoden für den DNA-Transfer

Ein erfolgreicher Transfer von DNA ist die Grundvoraussetzung für Mutageneseexperimente. Dabei kann sowohl lineare als auch zirkuläre DNA (Plasmide) übertragen werden. Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die auf natürlichen Eigenschaften oder auf physikalisch-chemischen Effekten beruhen. Die Methoden für den DNA-Transfer, die in Vertretern der Gattung *Bacillus* Anwendung finden, sind im Folgenden kurz beschrieben.

Die Transformation von natürlich kompetenten Zellen gehört zu den am häufigsten verwendeten Methoden für den DNA-Transfer in *B. subtilis* 168 (Anagnostopoulos

and Spizizen, 1961). Natürliche Kompetenz in *Bacillus* ist ein physiologischer Wachstumszustand, den ein Teil der Zellen während des Übergangs zwischen exponentieller und stationärer Phase erreichen (Smits, et al., 2005). Während sich bei *B. subtilis* 168 sehr hohe Transformationsraten erzielen lassen, konnten solche bisher für die meisten *B. licheniformis* Vertreter nicht erzielt werden. Eine Ausnahme stellt *B. licheniformis* 9945A dar, der bereits sehr früh als natürlich kompetent beschrieben wurde (Gwinn and Thorne, 1964). Für den Typ-Stamm *B. licheniformis* DSM13 nahmen Rey, et al., 2004 und Veith, et al., 2004 an, dass ein Grund seiner geringen natürlichen Kompetenz eine Transposoninsertion innerhalb des *comP* Genes ist. Das Gen *comP* kodiert für eine Histidin-Kinase, die zu einem frühen Zeitpunkt in der Induktion der natürlichen Kompetenz aktiv ist. Die Induktion der natürlichen Kompetenz erfolgt durch Quorum-Sensing. Dabei wird das Pheromon ComX, zuvor prozessiert durch ComQ, an das Medium abgegeben. ComX aktiviert die membranständige Histidinkinase ComP, die wiederum ComA phosphoryliert. In seiner phosphorylierten Form aktiviert ComA über ComS den zentralen Regulator ComK, der letztlich die Kompetenz induziert (Hamoen, et al., 2003).

Für die Übertragung von Plasmid DNA wird häufig die Transformation von Protoplasten durch PEG verwendet (Chang and Cohen, 1979). Bei dieser Methode wird die Zellwand Gram-positiver Bakterien durch Lysozym oder andere Muramidasen verdaut. Die Erzeugung der Protoplasten erfolgt in einem osmotisch-stabilisierenden Puffer, so dass eine Lyse der Bakterienzellen verhindert wird. Durch die Zugabe von PEG wird die Zellmembran permeabel für DNA. Nach der Transformation erfolgt die Regeneration der Protoplasten. Die Elektroporation ist eine weitere Transformationsmethode zur Übertragung von Plasmid DNA. Durch einen elektrischen Impuls wird ein Membranpotential erzeugt, das kurzfristig die Permeabilität der Zellmembran erhöht (Tsong, 1991). Dies ermöglicht die Aufnahme von DNA in die Zellen. Eine Kombination aus PEG-induzierter Transformation und Elektroporation stellt die Protoplasten-Elektroporation dar (Romero, et al., 2006). Bei dieser Methode wird die Zellwand Gram-positiver Bakterien verdaut, um eine effektivere Elektroporation zu ermöglichen. Diese Methode wird vor allem für Stämme genutzt, die sich nicht elektroporieren lassen.

Konjugation ist eine sehr effektive Methode, um DNA zu übertragen, da im Gegensatz zur Transformation von Protoplasten und Elektroporation die Methodik nur in geringem Maße an Stammspezifitäten angepasst werden muss. Für die Konjugation werden Donorstämme benötigt, die die Gene für die Ausbildung der Konjugation

besitzen. Diese Gene können Plasmid- oder Chromosomen-kodiert vorliegen (Itaya, et al., 2006, Purdy, et al., 2002, Simon, et al., 1983). Das Helferplasmid pLS20 ermöglicht Konjugation innerhalb der Gattung *Bacillus* (Itaya, et al., 2006, Koehler and Thorne, 1987, Sakaya, et al., 2006). Plasmide, die durch dieses System mobilisiert werden können, sind pLS30, pUB110 und pBC16.

Neben Konjugation innerhalb einer Gattung ist vor allem die Konjugation zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien von großem Interesse. Trieu-Cuot, et al., 1987 konstruierten den Shuttle Vektor pAT187, der den Transferursprung für die Konjugation des Plasmides RK2 besitzt. Das Plasmid RK2 gehört zur Gruppe der IncP-1 α Plasmide, die ein großes Übertragungsspektrum besitzen (Pansegrau, et al., 1994). Für den Vektor pAT187 konnte gezeigt werden, dass er auf unterschiedliche Gram-positive Bakterien übertragen werden konnte (Trieu-Cuot, et al., 1987). Für die Konstruktion des Plasmides pKV12 wurde ebenso auf diesen Transferursprung zurückgegriffen (Strätz, et al., 1994). Dieses Plasmid besitzt darüber hinaus eine Tetrazyklin-Resistenz mit einem breiten Wirtsspektrum. Dieses Resistenzgen stammt ursprünglich aus dem Transposon Tn916 (Bertram, et al., 1991). Der oriT ist der einzige Bereich, der für die Übertragung des Plasmides notwendig ist (Pansegrau, et al., 1994). Alle weiteren für die Konjugation essentiellen Gene können vom Donorstamm zur Verfügung gestellt werden, wie es in *E. coli* S17-1 und *E. coli* CA434 der Fall ist (Purdy, et al., 2002, Simon, et al., 1983).

1.3. Restriktions-Modifikations-Systeme

Restriktions-Modifikations-(RM)-Systeme schützen die Zelle vor fremder DNA und setzen sich in den meisten Fällen aus Enzymen mit zwei entgegengesetzten Aktivitäten zusammen (Tock and Dryden, 2005). Ein Restriktionsenzym erkennt und schneidet eine spezifische DNA-Sequenz, während eine DNA-Methyltransferase die gleiche Erkennungssequenz methyliert und so vor dem Restriktionsenzym schützt. Die DNA-Methyltransferase schützt auf diese Weise die bakterieneigene DNA vor Restriktion, während Fremd-DNA mit falscher oder fehlender Methylierung durch die Endonuklease hydrolysiert wird. Methylierung kann auch andere zelluläre Prozesse in Bakterien beeinflussen, wie Gentranskription, "DNA mismatch"-Reparatur, Initiation der Chromosomreplikation und Nukleoid-Struktur (Løbner-Olesen, et al., 2005). RM-Systeme werden in die folgenden vier Klassen eingeteilt (Roberts, et al., 2003, Tock and Dryden, 2005).

TypI-RM-Enzyme bilden hetero-oligomerische Komplexe, die normalerweise aus zwei Restriktions- (HsdR), zwei Methylierungs- (HsdM) und einer Spezifitätsuntereinheit bestehen (HsdS) (Murray, 2000). Die HsdS-Untereinheit vermittelt die Spezifität der Restriktions- und Methylierungsuntereinheit durch zwei Domänen, die die Erkennung der Zielsequenz übernehmen. Dadurch besitzen TypI-RM-Systeme unterschiedliche Erkennungs- und Zielsequenzen für die Restriktion. Die Restriktionsschnittstelle kann bis zu 1000 bp von der Erkennungsstelle entfernt liegen.

TypII-RM-Systeme setzen sich aus zwei separaten Enzymen zusammen, die beide gleiche Erkennungssequenzen besitzen. Die Erkennungssequenzen sind normalerweise palindromisch aufgebaut. Die Hydrolyse der DNA kann entweder in der Erkennungssequenz oder in ihrer unmittelbaren Umgebung erfolgen. TypII-DNA-Methyltransferasen weisen konservierte Motive in ihrer Aminosäuresequenz auf. TypII-Endonukleasen besitzen dagegen sehr unterschiedliche AS-Sequenzen, weshalb für ihre Klassifizierung eine Einteilung in elf überlappende Untergruppen notwendig war (Roberts, et al., 2010).

TypIII-RM-Systeme sind den TypI-RM-Systemen sehr ähnlich. Sie bilden einen einzelnen hetero-oligomeren Komplex, der die Restriktion und die Modifikation vermittelt (Dryden, et al., 2001). Die Modifikationsuntereinheit (Mod) wird für die Substraterkennung und für die Modifikation benötigt, während die Restriktionsuntereinheit (Res) nur aktiv ist, wenn sie in Kombination mit der Modifikationsuntereinheit vorliegt (Janscak, et al., 2001). Die Restriktionsschnittstelle liegt 25 bis 27 bp von der Erkennungssequenz entfernt (Tock and Dryden, 2005).

TypIV-RM-Enzyme sind Endonukleasen, die nur modifizierte DNA schneiden. Diese Enzyme erkennen methylierte, hydroxymethylierte und glukosylhydroxymethylierte DNA. Dazu gehören insbesondere das McrABC und das Mrr-System aus *E. coli* (Raleigh and Wilson, 1986, Stewart, et al., 2000). Die Erkennungssequenz des McrBC-Systems ist zweigeteilt, wobei an beiden Positionen eine Cytosin-Methylierung vorliegen muss. Die Größe des Bereiches zwischen den beiden Erkennungssequenzen kann zwischen 30 bp und 4000 bp variieren. Die Schnittstelle liegt innerhalb dieses Bereiches. Mrr ist aktiv auf N6-Methyladenin enthaltender DNA, während McrA und McrBC Veränderungen an Cytosin erkennen können, speziell 5-Methylcytosin, 5-Hydroxymethylcytosin und N4-Methylcytosin (Kelleher and Raleigh, 1991, Waite-Rees, et al., 1991).

Bei drei der vier Klassen von RM-Systemen (TypI, TypIII-IV) kann eine Translokation der DNA im Zuge der Restriktion erfolgen (Dryden, et al., 2001).

Um RM-Barrieren während einer Transformation zu umgehen, müssen RM-Systeme inaktiviert oder das entsprechende Methylierungsmuster erzeugt werden. Inaktivierung der RM-Systeme, im Speziellen der Restriktionsenzyme, erfolgt durch Mutagenese. *B. licheniformis* MW3, eine restriktionsdefiziente Mutante des Typ Stammes *B. licheniformis* DSM13, wurde durch Deletion der *hsdR*-Gene erzeugt (Waschkau, et al., 2008). Für die Erzeugung bestimmter Methylierungsmuster stehen zwei Methoden zur Auswahl. Bei einer *in vivo*-Methylierung werden die bakterieneigenen DNA-Methyltransferasen oder entsprechende Isoschizomere für eine Methylierung in *E. coli* eingesetzt. Ein entsprechendes System wurde bereits für *Clostridium acetobutylicum* etabliert (Mermelstein and Papoutsakis, 1993). Neben *in vivo*- ist auch eine *in vitro* Methylierung möglich. Hierfür wird eine DNA-Methyltransferase in einem entsprechenden Puffersystem eingesetzt, um das gewünschte Methylierungsmuster zu erzeugen (Chen, et al., 2008, Jennert, et al., 2000).

1.4. Mutagenese

Die Sequenzierung und Annotation ganzer Genome hat die Untersuchung neuer Gene und komplexer biochemischer Stoffwechselwege möglich gemacht. Für die Nutzung dieser Informationen, speziell auf dem Gebiet der Genomoptimierung, werden einfache und effiziente Methoden zur Manipulation von Genen und größeren Genombereichen benötigt.

Mutagenese-Systeme werden im Allgemeinen in gerichtete und ungerichtete Methoden unterteilt (Harwood and Cutting, 1990). Ungerichtete Systeme erzeugen Mutationen an zufälligen Positionen im Genom eines Organismus. Von Interesse für postgenomisches Arbeiten ist hierbei vor allem die Transposonmutagenese. Da die Integrationen nicht über homologe Bereiche und in den meisten Fällen zufällig im Genom erfolgen, wird diese Methode zur Erzeugung von Zufallsmutanten verwendet. Ein resultierender Phänotyp kann anschließend auf seine genetischen Grundlagen untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist das Transposon TnYLB-1 zu nennen, das über die Himar1 Transposase in TA-Dinukleotid-Zielsequenzen integriert wird (Le Breton, et al., 2006). Dieses System wurde erfolgreich für die Erzeugung von Zufallsmutanten in *B. subtilis* eingesetzt.

Die einfachste Art einer zielgerichteten Mutagenese stellt die Verwendung eines positiven Selektionsmarkers dar. In diesem Fall wird beispielsweise ein Antibiotika-Resistenz-Gen mit Hilfe flankierender homologer Bereiche in das Genom eingebracht. Auf diese Weise können auch Deletionen erzeugt werden. Jedoch ist die Anzahl der möglichen Mutationen von der Zahl der zur Verfügung stehenden Resistenzgene abhängig. Um Resistenzgene nach der Mutagenese zu entfernen, werden oft Gegenselektionsmarker eingesetzt (Reyrat, et al., 1998). In den meisten Fällen benötigen diese Systeme eine Modifikation des Ausgangsstammes, wie es beispielsweise bei Einsatz der Gene *upp* (Uracil-Phosphoribosyl-Transferase) und *blaI* (β -Laktamase Repressor) der Fall ist (Brans, et al., 2004, Fabret, et al., 2002). Yu, et al., 2010 entwickelten eine Methode zur Einführung markerfreier Deletionen in das Genom von *B. subtilis*, das keine Modifikationen des Ausgangsstammes voraussetzt. Hierfür nutzten sie das unter die Kontrolle eines Xylose-Promotors stehende Toxin MazF als Gegenselektionsmarker. Bisher etablierte Systeme; die Gegenselektionsmarker nutzen, sind auf natürlich kompetente Organismen, wie *B. subtilis* 168, beschränkt. Einen anderen Weg der Erzeugung markerfreier Deletionen gingen Yan, et al., 2008. Sie nutzten das Sequenz-spezifische Cre/lox-Rekombinationssystem für die Entfernung von Resistenzmarker. Nach deren Entfernung hinterlässt das Cre/lox-Rekombinationssystem aufgrund seiner Sequenz-spezifität ein Restsequenzmotiv. Dieses System benötigt für einen schnellen und effizienten Einsatz ebenfalls einen natürlich kompetenten Organismus. Für die Erzeugung von markerfreien Deletionen in *E. coli* wird ebenfalls auf ein exogenes Rekombinationssystem zurückgegriffen. Dieses System basiert auf einer Lambda-Red-Rekombination und erzeugt eine markerfreie Deletion innerhalb von 48 h (Yu, et al., 2008)

Für die Herstellung von markerfreien Deletionen in nicht-natürlich-kompetenten Vertretern der Gattung *Bacillus* wird auf plasmidbasierte Systeme zurückgegriffen. Plasmide, wie pMAD und pSKE194, nutzen einen temperatursensitiven Replikationsursprung für eine gezielte Integration (Arnaud, et al., 2004, Nahrstedt, et al., 2005). Der Replikationsursprung geht auf eine mutagenisierte Variante des Plasmids pE194 aus *Staphylococcus aureus* zurück (Villafane, et al., 1987). Die Replikation des Plasmids pE194ts kann nur bei Temperaturen unter 37 °C erfolgen. Durch Inkubation über 37 °C und Einsatz von Antibiotika-Resistenzen kann gezielt auf eine Integration des Deletionsvektors selektiert werden. Die Integration erfolgt durch homologe Rekombination der Flankenbereiche der Deletionskassette mit

dem entsprechenden Zielbereich im Genom. Bei den Vektoren pMAD und pSKE194 handelt es sich um Shuttlevektoren, die die Fähigkeit zur Replikation in *E. coli* und *Bacillus* besitzen. Der Vektor pMAD weist im Gegensatz zu pSKE194 ein Gen auf, das für eine β -Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym ermöglicht durch Verwendung des Chromophors X-Gal eine Blau-Weiß-Selektion, die eine schnelle Identifizierung plasmidfreier Klone zulässt.

1.5. Ziele der Arbeit

Die Verbesserung der genetischen Zugänglichkeit verschiedener *B. licheniformis* Stämme war ein Ziel dieser Arbeit. Es sollten verschiedene Methoden des DNA-Transfers für die Verbesserung der genetischen Zugänglichkeit getestet werden. Hierzu gehörten die Etablierung eines Protokolls zur Elektroporation von *B. licheniformis* und die Herstellung von konjugativen Shuttlevektoren. Darüber hinaus sollten neue Vektoren für den Einsatz in der Mutagenese von *B. licheniformis* erzeugt werden, die den Ansprüchen dieses Organismus besser entsprachen. Neben Methoden für die Erzeugung von Deletionen in Genen und ganzen Genombereichen stand auch die Etablierung einer Methode zur gezielten Integration von Genen und Genclustern ins Genom von *B. licheniformis* im Vordergrund. Neben dem Typ-Stamm *B. licheniformis* DSM13 sollte auch ein Produktionsstamm der Firma Henkel als Untersuchungsobjekt verwendet werden.

Des Weiteren sollte der Genpool für die Optimierung von *B. licheniformis*-Stämmen erweitert werden. Im Zuge dessen sollte die Genomsequenz von *B. licheniformis* 9945A, eines natürlich kompetenten Vertreters dieser Spezies, ermittelt und analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und Plasmide sind in Tab. 2.1 und Tab. 2.2 dargestellt.

Tab. 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Stämme

Stamm	Beschreibung	Quelle/ Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5alpha	F- <i>supE44 lacZ M15 lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> λ	(Woodcock, et al., 1989)
<i>Escherichia coli</i> S17-1	SmR, TpR, mod+, res-, thi, pro, recA-, RP4-Tc: :Mu-Km: :Tn7	(Simon, et al., 1983)
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> INV110	F ⁺ { <i>traΔ36 proAB lacIq lacZΔM15</i> } <i>rpsL (Str^R) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) Δ(mcrC-mrr)102::Tn10 (Tet^R)</i>	Invitrogen
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3	Restriktionsdefiziente Mutante von <i>B. licheniformis</i> DSM13	(Waschkau, et al., 2008)
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3.1	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit Deletion des PBSX-orthologen Prophagen	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3.2	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit Insertion des Urease-Gen-Clusters	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A	Wildtyp	BGSC
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB3610	<i>B. subtilis</i> DSM402 Vorläuferstamm	(Zeigler, et al., 2008)
<i>Bacillus subtilis</i> DSM402	<i>B. subtilis</i> 168	DSMZ
<i>Bacillus licheniformis</i> H1		Fa. Henkel
<i>Bacillus licheniformis</i> H1.1	<i>B. licheniformis</i> H1 mit Deletion in Gen Bh02419	Diese Arbeit

Tab. 2.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Stamm/ Plasmid	Beschreibung	Quelle/ Referenz
pCC1FOS™	Chl ^R	Invitrogen
pCR4 Topo	Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen
pCR®-XL-TOPO®	Kan ^R , Zeo ^R	Invitrogen
pMAD	Ery ^R , Amp ^R	(Arnaud, et al., 2004)
pKV12	Kan ^R , Tet ^R	(Strätz, et al., 1994)
pKVM1	Ery ^R , Amp ^R , <i>pre</i>	Diese Arbeit
pKVM2	Tet ^R , <i>pre</i> ⁻	Diese Arbeit
pKVM3	Tet ^R , Amp ^R , <i>pre</i> ⁻	Diese Arbeit
pKVM1 ΔBli01314- Bli01353	pKVM1 mit Kassette zur Deletion des PBSX.orthologen Phagens	Diese Arbeit
pKVM2 <i>ureAH ureT</i>	pKVM1 mit Urease-Insertionskassette	Diese Arbeit
pColA-Duet	Kan ^R , Expressionsvektor mit 2 MCS	Invitrogen
pIMV1	pColA-Duet mit Methyltransferase 2	Diese Arbeit
pIMV2	pColA-Duet mit Methyltransferase 1 und 2	Diese Arbeit
pMAD ΔBh2419	pMAD mit Kassette zur Deletion von Bh02419	Diese Arbeit

2.2. Nährmedien

In dieser Arbeit wurden Medien eingesetzt, die für die Anzucht von *Bacillus*-Spezies und *Escherichia coli* optimiert sind. Die Medien wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedium wurde den Ansätzen 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Hitzelabile Medienzusätze, wie beispielsweise Antibiotika, wurden in den meisten Fällen sterilfiltriert und dem Festmedium nach Abkühlen auf unter 55 °C zugefügt. Wurden die Zusätze in Ethanol oder Dimethylformamid gelöst, wurde auf eine Sterilfiltration verzichtet. Flüssigmedien wurden diese Zusätze direkt vor Gebrauch zugegeben. Die Stamm- und Arbeitskonzentrationen der Medienzusätze sind aus Tab. 2.3 zu entnehmen. Zuckerzusätze, wie Glukose, wurden separat autoklaviert und anschließend dem sterilen Medium zugefügt.

Tab. 2.3: Mediumszusätze

Mediumszusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	100 µg/ml
Erythromycin	5 mg/ml in EtOH 70 %	5 µg/ml
Tetrazyclin	20 mg/ml in EtOH 70 %	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	50 µg/ml
Polymyxin B	40 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	20 µg/ml
IPTG	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	40 µg/ml
X-Gal	8 % in N,N-Dimethylformamid	0,008 %
Lysozym	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	100 mg/ml
Proteinase K	40 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	20 µg/ml

2.2.1. Nährmedien für *E. coli*

E. coli Kulturen wurden standardmäßig in LB-Medium angezogen. Medienzusätze wurden wie oben beschrieben entsprechend der Konzentrationen aus Tab. 2.3 zugegeben.

Für Transformationen (siehe 2.14.1) wurde SOC-Medium zur Regeneration verwendet. Die Salzbestandteile dieses Mediums wurden getrennt autoklaviert und anschließend dem restlichen Medium steril zugesetzt.

Luria-Bertani-(LB)-Medium		SOC-Medium	
Trypton	10 g	Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g	NaCl	10 mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml	KCl	2,5 mM
		MgCl	10 mM
		MgSO ₄	10 mM
		H ₂ O _{bidest.}	ad 1000ml

2.2.2. Nährmedien für *Bacillus*

Bei der Kultivierung von Vertretern der Gattung *Bacillus* wurden sowohl komplexe Medien als auch ein Minimalmedium verwendet. Medienzusätze wurden, wie oben beschrieben, entsprechend der Konzentrationen aus Tab. 2.3 zugegeben.

modifiziertes LB-Medium (LB_{mod.})	Nährbouillon-Medium (NB)
Trypton 10 g	Nährbouillon 8 g
Hefeextrakt 5 g	H ₂ O _{bidest.} ad 1000 ml
NaCl 5 g	
H ₂ O _{bidest.} ad 1000 ml	

Für die Anzucht in einem definierten Medium wurde auf das Mineralmedium nach Veith, et al., 2004 zurückgegriffen. Die Zusammensetzung des Mineralmediums und der Spurenelementlösung SL9 sind im Folgenden dargestellt.

Minimalmedium

1 M NH ₄ Cl/ 0,5 M Urea	10 ml
100 mM CaCl ₂	1 ml
500 mM MgSO ₄	1 ml
400 mM Phosphatpuffer (400 mM Na ₂ HPO ₄ mit 400 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 7,5 eingestellt)	100 ml
SL9	1 ml
1 M Glukose	50 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Spurenelementlösung 9 (SL9)

EDTA	5,2 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	2,1 g
CaCl ₂ 6H ₂ O	0,19 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,144 g
MnCl ₂ H ₂ O	0,1 g
NaMoO ₄ H ₂ O	36 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
NiCl ₂ 6 H ₂ O	24 mg
CaCl ₂ 2 H ₂ O	2 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Das Mineralmedium setzt sich aus den oben aufgeführten Komponenten zusammen, wobei der Phosphatpuffer separat autoklaviert wurde. Bei der Verwendung von Harnstoff anstelle von Ammonium als Stickstoffquelle wurde die Harnstoff-Lösung sterilfiltriert und anschließend dem sterilen Medium zugegeben.

2.3. Zellanzucht

Die Zellanzucht im Allgemeinen erfolgte in Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen, um für eine gute Durchlüftung zu sorgen. *E. coli* und Vertreter der Gattung *Bacillus* wurden aerob bei 37 °C schwenkend auf einem Rührschüttler bei 150 UpM angezogen. Kulturen bis zu einem Volumen von 10 ml wurden mit jeweils einer Kolonie angeimpft. Bei Anzuchtversuchen in größeren Volumina wurde mit einer Vorkultur gearbeitet. Hierfür wurde 1 % des Volumens der Hauptkultur aus der Vorkultur entnommen, um damit die Hauptkultur zu beimpfen.

Die Anzucht von *E. coli* und Vertretern der Gattung *Bacillus* auf Festmedium erfolgte bei 37 °C über Nacht in einem Heraeus Brutschrank der Firma Thermo Fisher Scientific (Bonn).

2.4. Stammhaltung

Für die kurzfristige Stammhaltung wurden *E. coli*- und *Bacillus*-Stämme auf LB-Medium ausgestrichen, bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend für maximal 4 Wochen im Kühlschrank gelagert. Für die langfristige Stammhaltung von *E. coli* und Vertretern der Gattung *Bacillus* wurde 1 ml einer ÜN-Kultur mit 0,5 ml einer 87 %igen (w/v) Glycerinlösung versetzt. Die Ansätze wurden anschließend bei - 80 °C gelagert.

2.5. Reinheitskontrollen

Flüssigkulturen wurden regelmäßig auf ihre Reinheit überprüft, indem Verdünnungsausstriche auf entsprechenden Agarplatten angelegt wurden. Darüber hinaus wurden Proben im Phasenkontrastmikroskop BX41 (Fa. Olympus, Hamburg) untersucht. Bei dieser Überprüfung wurden auf abweichende Eigenschaften in der Kolonie- und Zellmorphologie geachtet.

2.6. Bestimmung der optischen Dichte

Über die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde der Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen bestimmt. Hierfür wurde ein UV/Vis Spektrometer (Ultrospec®3300pro, Fa. Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Als Referenz diente unbeimpftes Medium. Um Messungengenauigkeiten zu vermeiden, wurden die Proben ab einem Wert von 0,3 verdünnt.

2.7. Anreicherung von Phagenpartikel

Für die Anreicherung von Phagenpartikel wurden diese mittels PEG gefällt (Clokic and Kropinsk, 2008). Die Überstände nach Induktion des Phagen wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Diese wurden mit RNaseA (Fa. Qiagen, Hilden) und DNaseI (Fa. Roche, Mannheim) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Endkonzentration der beiden Enzyme betrug 1 µg/ml. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 8000 g und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde erneut abgenommen und sterilfiltriert, um letzte bakterielle Rückstände zu entfernen. Daraufhin wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend mit PEG8000 bis zu einer Konzentration von 10 % (v/v) versetzt. Die Phagen-Präzipitation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Das Phagen-Präzipitat wurde anschließend bei 9000 g und 4 °C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in TE-Puffer gelöst.

2.8. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Phagenlysaten erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Hoppert. Die Proben wurden mit Uranylacetat negativkontrastiert. Hierfür wurde ein Teil der Probe auf einen Formvar-Film, der sich auf 300 mesh-Netzchen (Fa. Plano, Wetzlar) befand, aufgebracht. Das Netzchen wurde auf einen Tropfen der Probe aufgelegt und für eine Minute inkubiert. Anschließend ließ man die Probe kurz auf dem Objektträger antrocknen. Dieser wurde kurz mit H₂O gewaschen und schließlich für 1 bis 2 sek mit Uranylacetat negativkontrastiert. Reste von Uranylacetat wurden mit einem Filterpapier abgenommen. Die Proben wurden im Anschluss in einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Fa. Zeiss, Jena) untersucht.

2.9. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.9.1. Vorbereiten von Geräten und Lösungen für das molekulargenetische Arbeiten

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck) sterilisiert. Hitzelabile Geräte wurden entweder mit 70 %igen Ethanol gespült oder mit 96 %igen abgeflammt. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.9.2. Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit Hilfe eines Nanodrop (Nanodrop 1000, Fa. Peqlab, Erlangen) anhand der Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Nullabgleich erfolgte mit bidestilliertem Wasser, sofern dieses für die Elution der DNA verwendet wurde. Wurde die DNA in Pufferlösungen gelöst, wurden diese für den Nullabgleich herangezogen. Bei einer OD_{260} von 1 wurde bei doppelsträngiger DNA ein Wert von 50 ng/µl angenommen. Die Reinheit der DNA wurde mit Hilfe der Absorption bei 230 und 280 nm abgeschätzt. Reine DNA weist für das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} einen Wert von 1,8 auf, für das Verhältnis OD_{260} zu OD_{230} einen Wert von 2,2 (Sambrook, 2001). Kontamination, wie etwa Phenol oder Proteine, erhöhen die Absorption bei 280 nm, während Polysaccharide für eine erhöhte Absorption bei 230 nm sorgen.

2.9.3. Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke wurde auf das "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) zurückgegriffen. Hierfür wurden 2 ml einer *E. coli* ÜN-Kultur verwendet. Die Zellen wurden mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Die Isolierung der DNA erfolgte über ein Säulensystem bestehend aus einer Silikat-Gel-Membran. Für Plasmid-Präparationen im 96er Maßstab kam ein BioRobot 8000 (Fa. Qiagen, Hilden) zum Einsatz. Dabei wurde auf das "QIAprep 96 Turbo BioRobot Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) zurückgegriffen. Klone wur-

den in "Flat-Bottom Blocks", die mit 2 ml LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum gefüllt worden waren, inokuliert. Die Anzucht wurde, wie unter 2.3 beschrieben, durchgeführt. Die Präparation der Plasmide im 96er Maßstab erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

Für Plasmidaufreinigungen aus *Bacillus*-Stämmen fand ebenfalls das "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) Anwendung. Für die Aufreinigung wurden 4 ml einer exponentiell gewachsenen Flüssigkultur verwendet. Der alkalischen Lyse ging ein 20 minütiger Inkubationsschritt mit 100 µl einer 100 mg/ml Lysozymlösung voraus.

Für präparative Zwecke wurde auf das "QIAGEN Plasmid Midi Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) zurückgegriffen. Abhängig von der Kopienzahl des Plasmids wurden entweder 50 ml ("high copy") oder 100 ml ("low copy") einer *E. coli* ÜN-Kultur verwendet.

2.9.4. Isolierung von genomischer DNA

Die Aufreinigung genomischer DNA wurde mit Hilfe des „Master Pure DNA Purification Kits" (Fa. Epicentre, Madison, U.S.A) durchgeführt. Hierfür wurden 2 ml einer exponentiell gewachsenen *Bacillus*-Kultur verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe von Proteinase K bei 65 °C lysiert. Nach der Lyse wurde die enthaltene RNA durch Zugabe von RNase A abgebaut. Im Anschluss erfolgten eine Fällung der enthaltenen Proteine und schließlich die Präzipitation der DNA durch Zugabe von Isopropanol. Nach dem Waschen mit 70 %igen Ethanol wurde die genomische DNA in 10 mM Tris-Puffer pH 7,5 resuspendiert.

2.9.5. Agarose-Gelelektrophorese

2.9.5.1. Analytische Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren wurden horizontale Elektrophoresekammern der Fa. G&P Kunststofftechnik (Kassel) verwendet. Die verwendeten Gele bestanden aus 0,8 % (w/v) Agarose, die in 1x TAE-Puffer gelöst wurde. Die Agarose wurde in einer Mikrowelle aufgeköcht. Bei einer Temperatur von ca. 50 °C wurde die Agaroselösung in die Gelkammer gegossen und der gewünschte Kamm eingesetzt. Nach Abkühlen wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Ladepuffer versetzt. Als

Größenstandard wurden 3 µl eines 1 kb Längenstandards (GeneRuler 1 kb ladder bzw. GeneRuler DNA ladder mix, Fa. MBI Fermentas, St. Leon Rot) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung zwischen 60 und 90 V.

Nach Auftrennung der Nukleinsäuren wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 10 min inkubiert und anschließend in dest. Wasser 5 min entfärbt. Die Dokumentation der aufgetrennten Nukleinsäuren erfolgte in einer Gel-Dokumentationsanlage (ImageQuant 100, Fa. GE Healthcare, Freiburg) unter UV-Licht.

50x TAE-Puffer

Tris	242 g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,2 g
Eisessig	57,1 ml
H ₂ O _{bidest.}	<i>ad</i> 1000 ml
pH 8,5	

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,125 g
Xylencyanol	0,125 g
Ficoll 400	7,5 g
H ₂ O _{bidest.}	<i>ad</i> 50 ml

Ethidiumbromid-Färbebad

Ethidiumbromidlösung (2 mg/ml)	250 µl
H ₂ O _{bidest.}	<i>ad</i> 500 ml

2.9.5.2. Präparative Gelelektrophorese

Für die präparative Gelelektrophorese galten die gleichen Bedingungen, wie sie für die analytische beschrieben wurden (siehe 2.9.5.1). Um Schäden an der DNA durch Interkalation von Ethidiumbromid und UV-Licht zu vermeiden, wurden die Proben nach einem speziellen Schema auf das Gel aufgetragen. Zuerst wurden der Längenstandard und ein kleiner Teil der Probe in die ersten Geltaschen gegeben. Anschließend wurde der Rest der Probe auf möglichst wenige der darauf folgenden Geltaschen verteilt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde der Längenstandard zusammen mit dem kleineren Teil der Probe vom restlichen Gel abgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht wurde die Bande von Interesse mit einem Skalpell markiert. Anhand dieser Markierung konnte die ungefähre Höhe dieser Bande auf dem ungefärbten Teil abgegrenzt und ausgeschnitten werden. Die DNA wurde im Anschluss mittels Gel-Extraktion aus den Gelblöckchen

isoliert (siehe 2.9.7). Der verbliebene Rest des Gels wurde ebenfalls mit Ethidiumbromid gefärbt, um die Abtrennung zu überprüfen.

2.9.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Um Nukleotide, Puffer und Enzymereste aus PCR-Ansätzen zu entfernen, wurden diese generell aufgereinigt. Hierfür wurde das "Qiaquick PCR Purification Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet. Diese Methode basiert ähnlich dem "QIAprep Spin Miniprep Kit" (siehe 2.9.3) auf einem Säulensystem, das eine Silika-Gel-Membran enthält. Durch Bindung und Elution der DNA wird diese von unerwünschten Bestandteilen getrennt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.9.7. DNA-Gelextraktion

Die aus der präparativen Gelelektrophorese gewonnenen DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Dieses System ermöglicht die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agaroseblöckchen. Nach dem Aufschmelzen der Agaroseblöckchen in einem Hochsalzpuffer erfolgt die Aufreinigung über ein Silika-Gel-Membran-Säulensystem. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.9.8. Scheren von DNA

Für die Herstellung von Genbanken ist es notwendig, dass die dafür verwendete DNA eine gleichmäßige Fragmentierung aufweist. Hierfür wurde das "Hydroshear"-System (Fa. GeneMachines) verwendet. Die Fragmentierung der DNA erfolgte auf mechanische Weise. Gegenüber enzymatischer Fragmentierung besitzt dies laut Hersteller den Vorteil, dass der Doppelstrangbruch sich zufällig ereignet und keine Fragmente unter- oder überproportional vertreten sind.

In diesem System wird eine DNA-Lösung unter Druck durch eine kleine Öffnung gepresst. Die Scherkräfte, die dabei wirken, sorgen für eine Fragmentierung der DNA. Die Fragmentgröße kann durch den Druck und die Zahl der Wiederholungen gesteuert werden.

Für die Erzeugung von 3 kbp-Fragmenten wurde in der Regel das Geschwindigkeitsprogramm 13 mit 30 Wiederholungen angelegt, bei der Vorbereitung von DNA

für die Erzeugung von Fosmid-Banken Geschwindigkeitsprogramm 17 mit 25 Wiederholungen. Die Proben mit 3 kbp-Fragmenten wurden im Anschluss mittels präparativer Gelelektrophorese aufgetrennt und der 3 kbp-Bereich aus dem Gel extrahiert (siehe 2.9.5.2 und 2.9.7).

2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die *in vitro*-Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten und stellt eine zentrale Methode des molekulargenetischen Arbeitens dar. Für die PCR sind ein Oligonukleotidpaar, Matrizen-DNA (Template) sowie eine thermostabile DNA-Polymerase notwendig.

2.10.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten

Für die Amplifikation wurde standardmäßig das PCR-Extender-System (Fa. 5 Prime, Hamburg) verwendet. Als Puffer kam der darin enthaltene "Tuning-Buffer" zur Anwendung. Der Oligonukleotidprimer hatte im Durchschnitt eine Länge von 19 - 22 Nukleotiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. A1 dargestellt. Für eine optimale Amplifikation sollten die Oligonukleotide annähernd gleiche Schmelztemperaturen aufweisen. Der Schmelzpunkt eines Oligonukleotids ist abhängig von seinem GC-Gehalt und kann durch die nachfolgende Gleichung berechnet werden (Chester and Marshak, 1993).

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/L$$

% GC-Gehalt = prozentualer GC-Gehalt des Oligonukleotids

L = Länge des Oligonukleotids

Im Folgenden sind der Standardreaktionsansatz und das entsprechende PCR-Programm dargestellt. PCR-Amplifikate wurden zuerst mittels analytischer Gelelektrophorese überprüft und anschließend aufgereinigt (siehe 2.9.6). Lieferte eine PCR-Reaktion mehrere Banden, wurde eine präparative Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion durchgeführt (siehe 2.9.5.2 und 2.9.7). Alle PCR Reaktionen erfolgten in Thermocyclern der Fa. Clemens (Waldbüttelbronn).

Standard-PCR-Reaktionsansatz

Matrizen-DNA	1 μ l
Oligonukleotid 1	3 μ l
Oligonukleotid 2	3 μ l
dNTP-Gemisch (10 mM)	1 μ l
10x "Tuning buffer"	3,5 μ l
H ₂ O _{bidest.}	23 μ l
Polymerase (PCR Extender System)	0,5 μ l

Standard-PCR-Programm

Denaturierung	96 °C	2 min
Zyklen		30
Denaturierung	96 °C	15 sek
Anlagerung	T _m - 5	30 sek
Elongation	68 °C	45 sek/kbp
Elongation	68 °C	5 min

2.10.2. "Splicing with overlap extensions" (SOE)- PCR

Eine schnelle und effiziente Methode zur Fusion von PCR-Produkten stellt die SOE-PCR dar (Heckman and Pease, 2007). Dazu wurden vier verschiedene Oligonukleotide abgeleitet, die für die Amplifikation der beiden DNA-Fragmente genutzt wurden. Die beiden Oligonukleotide, über deren Enden die DNA-Fragmente schließlich fusioniert werden sollten, wurden am 5' Ende um die invers komplementäre Sequenz des jeweils anderen Oligonukleotids ergänzt. Diese Oligonukleotide verlängerten beide DNA-Fragmente im ersten Amplifikationsschritt um die Sequenz des jeweils anderen Oligonukleotids. Dadurch entstanden DNA-Fragmente, die über diese Überlappung durch Hybridisierung miteinander verbunden werden konnten. Die PCR wurde, wie unter 2.10.1 beschrieben, durchgeführt und anschließend aufgereinigt (siehe 2.9.6).

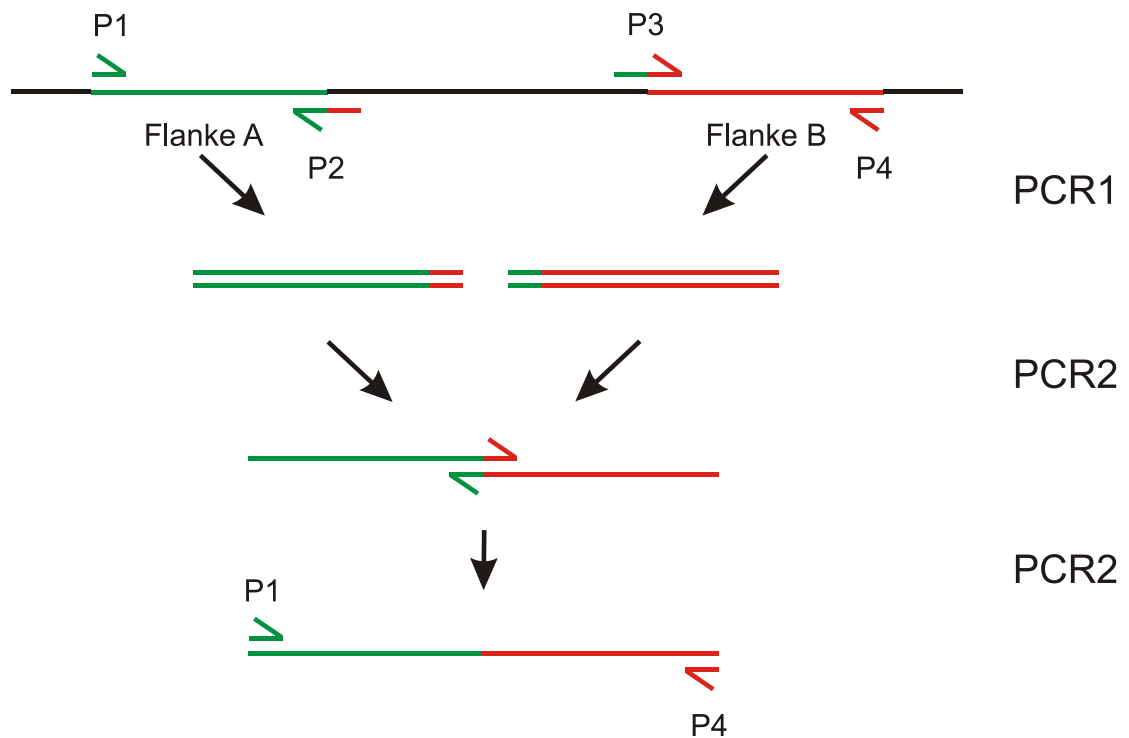


Abb. 2.1: Schema der SOE-PCR zur Fusion zweier DNA-Fragmente

Während der SOE-PCR dienen die angefügten Überhänge als "Primer" für das jeweils andere Fragment, so dass jedes der beiden Fragmente um das andere ergänzt wurde. Die beiden äußeren "Primer" dienen dazu, das Fusionsprodukt zu amplifizieren (siehe Abb. 2.1). Der für die SOE-PCR verwendete Reaktionsansatz und das entsprechende PCR-Programm sind nachfolgend dargestellt.

SOE-PCR-Reaktionsansatz

Flanke A	1 µl
Flanke B	1 µl
Oligonukleotid 1 Flanke A	3 µl
Oligonukleotid 2 Flanke B	3 µl
dNTP-Gemisch (10 mM)	1 µl
10x "Tuning buffer"	5 µl
H ₂ O _{bidest.}	35,5 µl
Polymerase (PCR Extender System)	0,5 µl

SOE-PCR-Programm

Denaturierung	96 °C	10 min
Zyklen		30
Denaturierung	96 °C	15 sek
Anlagerung	T _m - 5	30 sek
Elongation	68 °C	45 sek/kbp
Elongation	68 °C	10 min

Lieferte die SOE-PCR-Reaktion ein eindeutiges Ergebnis, wurde der Ansatz mit Hilfe des "Qiaquick PCR Purification Kits" aufgereinigt (siehe 2.9.6), war dies nicht der Fall, erfolgte eine präparative Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion (siehe 2.9.5.2 und 2.9.7.).

2.11. Enzymatische Modifikation von DNA

2.11.1. Restriktionsverdau

Bei Restriktionsverdau macht man sich die hohe Spezifität der Endonukleasen aus TypII-RM-Systemen zu nutze. Die Restriktionsenzyme erkennen meist palindromische Erkennungssequenzen im DNA-Doppelstrang und hydrolysieren an

einer bestimmten Stelle die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Basen. Dabei können überhängende oder auch glatte Enden entstehen.

Restriktionsverdau dienten sowohl analytischen als auch präparativen Zwecken. Für analytische Ansätze wurden lediglich 1 - 2 µg DNA in einem 20 µl-Ansatz inkubiert, wohingegen für präparative Zwecke bis zu 20 µg DNA in einem Volumen von 100 µl eingesetzt wurden. Es wurden zwischen 3 - 5 U Enzym/µg DNA verwendet. Der Verdau erfolgte in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem bei den empfohlenen Temperaturen. Für einen Verdau mit zwei Enzymen wurde ein Puffersystem ausgewählt, in dem beide Endonukleasen eine hohe Aktivität besaßen. War dies nicht möglich, erfolgt der Verdau nacheinander, wobei die Restriktion im Puffersystem mit niedriger Ionenstärke den Anfang nahm. Für den zweiten Verdau erfolgte eine Anpassung der Ionenstärke. War eine Inaktivierung des Restriktionsenzym notwendig, erfolgte diese unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Die Spaltung der DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.11.2. Dephosphorylierung

Um eine Religation restriktionsverdauter Vektoren zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphat-Gruppen der linearen Vektoren mit einer "Shrimp Alkaline Phosphatase" (Fa. Fermentas, St. Leon Rot) entfernt. Dies sollte die Ligation von Vektorfragmenten mit sich selbst und mit anderen linearen Vektorfragmenten verhindern. Die Dephosphorylierung wurde direkt im Verdauansatz durchgeführt, da die eingesetzte Phosphatase in allen verwendeten Restriktionspuffersystemen eine hohe Aktivität besaß. Es wurden 5 U Enzym/ µg DNA zugeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C. Die Phosphatase wurde bei 65 °C für 20 min inaktiviert.

2.11.3. Erstellen von glatten Enden ("Blunt Ends")

Um Überhänge an DNA-Fragmenten zu glätten, wurden diese mit einer T4-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon Rot) inkubiert. Dieses Enzym füllt 5'-Überhänge auf und schneidet durch seine 3'-Exonuklease-Aktivität 3'-Überhänge ab (Sambrook, 2001). Dies war vor allem bei der Erstellung von Genbanken notwendig, da die DNA bevor sie kloniert wurde, mechanisch gesichert wurde (siehe 2.9.8). Dadurch war eine Anpassung der Fragmentenden notwendig.

Für die Reparatur der Enden wurde folgender Ansatz verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C. Im Anschluss fand eine Aufreinigung der DNA statt (siehe 2.9.6).

Reaktionsansatz für die Erzeugung von glatten Enden

DNA	x µl
5x Reaktionspuffer	10 µl
dNTP (10mM)	5 µl
T4 DNA Polymerase (5 U/µl)	2 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µl

2.11.4. Erstellen von 3'-Adenosinüberhängen

Bei der Klonierung mit "TOPO TA Cloning[®] Kit" bzw. "TOPO XL Cloning Kit" (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) war es notwendig, dass DNA-Fragmente für die Klonierung am 3'-Ende Adenosinüberhänge aufwiesen. Lagen solche nicht vor, wurden diese durch eine *Taq*-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) erstellt. Die Erzeugung wurde in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 25 min bei 72 °C.

Reaktionsansatz für die Erzeugung von 3'-Adenosinüberhängen

DNA mit glatten Enden	x µl
dATP (2 mM)	6 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
10x Taq (NH ₄)SO ₄ Puffer ohne MgCl ₂	7 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 70 µl

Im Anschluss wurden die Proben aufgereinigt (siehe 2.9.6) und für TOPO-TA bzw. TOPO-XL-Klonierung herangezogen (siehe 2.12.3).

2.11.5. Ligation

Für Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase (Fa. Fermentas, St. Leon Rot) verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter Verbrauch von ATP die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxyl-Gruppe zweier DNA-Enden. Um eine hohe Ausbeute einer Vektor/Insert-Klonierung zu erzielen, wurde hierfür ein molares Vektor-Insert-Verhältnis von 1 zu 3 angelegt. Der folgende Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert und vor der Transformation für 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Ligationsansatz

Vektor	20 - 100 ng/kbp
Insert	60 - 300 ng/kbp
10x T4-Ligase Puffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 20 µl

2.12. Klonierung von DNA-Fragmenten

In dieser Arbeit fanden verschiedene Klonierungstechniken Anwendung. Neben Klonierungen durch Restriktion und Ligation stellte die Hybridisierung eine weitere Alternative dar.

2.12.1. Klonierung durch Restriktion und Ligation

Für die Klonierung durch Restriktion und Ligation musste sowohl die Vektor- als auch die Insert-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut werden. Die 5'-Phosphatgruppen des Vektors wurden durch Dephosphorylierung entfernt, um eine Religation zu vermeiden (siehe 2.11.2.). Für diese Art der Klonierung wurden die Vektoren pMAD, pColA-Duet und die Vektoren der pKVM-Serie herangezogen. Die Ligation erfolgte wie unter 2.11.5. beschrieben. Daran schloss sich die Transformation in chemisch oder elektrokompetente *E. coli* an (siehe 2.14). Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum.

2.12.2. Klonierung durch Hybridisierung

Die Klonierung durch Hybridisierung wurde vor allem für die Klonierung großer DNA-Fragmente eingesetzt. Damit konnte punktgenau und ohne die Generierung von neuen Restriktionsschnittstellen kloniert werden.

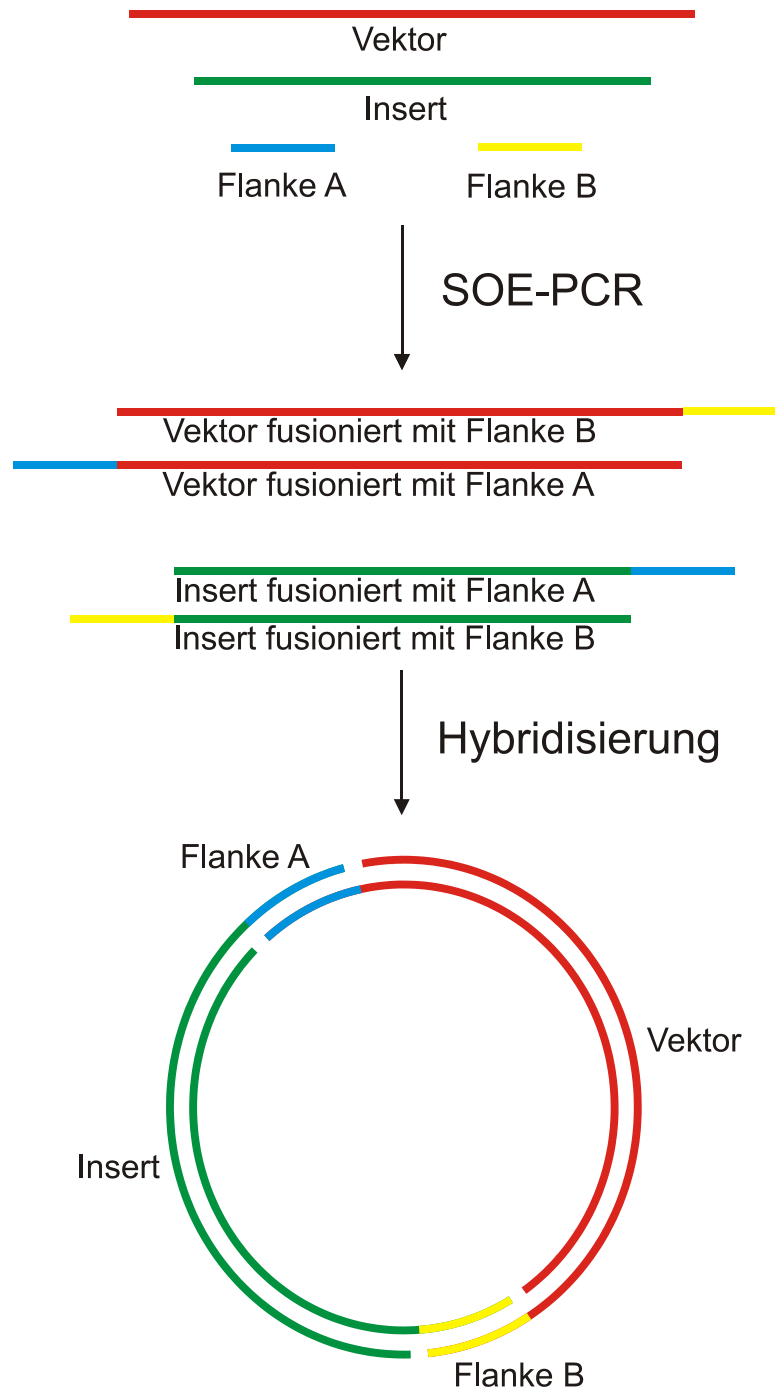


Abb. 2.2: Schema zur Hybridisierung für die Erzeugung eines Insertionsvektors

Hierfür mussten komplementäre Bereiche sowohl an das Insert als auch an den Vektor fusioniert werden. Dies erfolgte mit Hilfe der SOE-PCR (siehe 2.10.2). Es mussten insgesamt vier DNA-Fragmente erzeugt werden, die jeweils an einem Ende einen Überhang hatten, der zu jeweils einem Überhang eines anderen Fragmentes komplementär war. Dadurch entstanden jeweils zwei Sorten von Insert- und Vektorfragmenten, die gegenseitig miteinander hybridisieren konnten (siehe Abb. 2.2). Hierfür wurde nachfolgender Hybridisierungsansatz verwendet. Die Hybridisierung erfolgte im Thermocycler (Fa. Clemens, Waldbüttelbronn) unter Verwendung des folgenden Programmes.

Hybridisierungsansatz		Hybridisierungsprogramm	
Vektor PCR1	20 ng /kbp	Denaturierung (3 min)	95 °C
Vektor PCR2	20 ng /kbp		
Insert PCR1	20 ng /kbp	Zyklen	4
Insert PCR2	20 ng /kbp	Hybridisierung Schritt 1 (2 min)	65 °C
Tris(HCl) pH 8,5 (100mM)	5 µl	Hybridisierung Schritt 2 (15 min)	35 °C
EDTA (100 mM)	1 µl		
NaCl (2,5 M)	2 µl		
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µl		

Im Anschluss wurde der Ansatz in chemisch oder elektrokompetente *E. coli* transformiert (siehe 2.14). Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotikum.

2.12.3. TOPO -Klonierung

Die Klonierung mit Hilfe des "TOPO TA" bzw. "TOPO XL Cloning® Kits" (Invitrogen, Karlsruhe) stellt eine Methode zur direkten Klonierung von DNA-Fragmenten mit 3'-Adenosinüberhängen dar. Dieses System wurde vor allem für die Erstellung von Genbanken aus gescherter DNA und für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet.

Die durch Taq-Polymerasen generierten 3'-Adenosinüberhänge machte man sich in diesem Verfahren zunutze, indem sich diese an 3'-Thymidinüberhänge des Vek-

tors anlagerten. Die 3'-Thymidinüberhänge wurden durch eine Topoisomerase I erzeugt, die nach dem Erzeugen kovalent mit der 3'-Phosphatgruppe des geschnittenen DNA-Fragments verbunden blieben. Durch Anlagerung einer 5'-Hydroxylgruppe konnte es zur Umkehr der Reaktion kommen, was die Verknüpfung zweier DNA-Stränge und die Freisetzung der Topoisomerase I zur Folge hatte (Shuman, 1994).

Für die TOPO TA Klonierung wurde folgender Reaktionsansatz verwendet, der 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

TOPO-TA Reaktionsansatz

DNA	4 µl
"Salt Solution" (1:4 verdünnen)	1 µl
Vektor pCR4Topo	1 µl

Für eine TOPO-XL-Klonierung wurde folgender Reaktionsansatz verwendet, der 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 6X TOPO "Cloning Stop"-Lösung beendet.

TOPO-XL Reaktionsansatz

DNA	4 µl
Vektor pCR-XL-Topo	1 µl

Im Anschluss an beide TOPO-Klonierungsreaktionen erfolgte die Transformation in *E. coli* (siehe 2.14). Die Selektion wurde auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C durchgeführt.

2.12.4. Erstellen von Fosmid-Banken

Für die Erzeugung von Fosmid-Banken wurde auf den "Epi-Fos CopyControl™ Fosmid Library Production Kit" (Fa. Epicentre, Madison, U.S.A) zurückgegriffen. Hierfür wurde genomische DNA mit Hilfe des Hydroshear-Systems fragmentiert (siehe 2.9.8). Im Anschluss wurden glatte Enden erzeugt, um die DNA für eine Ligation in den pCC1FOS™-Vektor vorzubereiten. Der Ligationsansatz wurde

schließlich in Phagenpartikel verpackt und für eine Transduktion in *E. coli* EPI300™ verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.13. DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Analyse)

Die Southern-Analyse dient dem Nachweis von spezifischen DNA-Fragmenten in der Gesamt-DNA eines Organismus mit Hilfe markierter DNA-Sonden.

2.13.1. Markierung der DNA-Sonden

Die Markierung der für Southern-Analysen verwendeten DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des "Biotin DecaLabel DNA Labeling Kits" (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Die Methode basiert auf der Anlagerung von unspezifischen "Decanucleotid-Primer". Vom 3'-Ende erfolgt die Synthese des komplementären Stranges durch ein Klenow Fragment (exo⁻). Die Markierung vollzieht sich letztlich durch Inkorporation von Biotin-11-dUTP in den neusynthetisierten DNA-Strang. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die dafür notwendigen Reagenzien lagen dem Kit bei.

2.13.2. Restriktionsverdau und Auftrennung der DNA

Für die Southern-Analyse musste die genomische DNA eines Organismus zuerst mittels geeigneter Endonukleasen verdaut werden. Es wurde darauf geachtet, dass das Restriktionsenzym nicht in dem Hybridisierungsbereich schnitt, um eindeutige Signale zu erhalten. Einen weiteren Punkt stellte die Erzeugung von DNA-Fragmenten dar, die in ihrer Größe innerhalb des Längenstandards lagen und einen deutlichen Größenunterschied für den Vergleich zweier Genotypen besaßen.

Nach dem Verdau wurden die Ansätze elektrophoretisch (60 V, 2 h) in einer horizontalen Gelkammer (Fa. Hoefer, Holliston, USA) aufgetrennt. Längenstandards wurden ebenso biotinmarkiert. Im Anschluss wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert.

2.13.3. DNA-Transfer auf Nylonmembran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Fa. Roche, Mannheim). Die Nylonmembran wurde

an die Maske, die für den Vakuum-Blotter (Model 785 Vacuum Blotter, Fa. BioRad, München) verwendet wurde, angepasst, so dass die Öffnung der Maske vollständig von der Membran abgedeckt wurde. Anschließend wurde die Nylonmembran auf die Ansaugfläche gelegt und die Maske darauf aufgebracht. Das Gel wurde schließlich auf die Öffnung der Maske gelegt, so dass das Gel in Kontakt mit der Membran stand.

Nach Anlegen des Vakuums (5-10 inHg) wurde das Gel mit den nachfolgend aufgeführten Puffern und Lösungen überschichtet. Die Reihenfolge und Dauer des Auftrages ist in Tab. 2.4 dargestellt. Nach Abschluss des DNA-Transfers wurde die Membran aus der Apparatur entnommen. Die DNA wurde für 1 min mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) auf der Membran fixiert.

Depurinierungslösung

HCl	0,25 M
-----	--------

Denaturierungslösung

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Neutralisierungslösung

Tris-HCl pH 7,5	0,5M
NaCl	3 M

Transferlösung (20 x SSC)

NaCl	3 M
Na ₃ -Citrat pH 7,0	0,3 M

Tab. 2.4: Reihenfolge des Auftrages für den DNA-Transfer

Inkubationsschritt	Anzahl	Dauer
Auftrag der Depurinierungslösung	1x	10 min
Waschen mit H ₂ O _{bidest.}	2x	1 min
Auftrag der Denaturierungslösung	2x	15 min
Waschen mit H ₂ O _{bidest.}	2x	1 min
Auftrag der Neutralisierungslösung	2x	15 min
Waschen mit H ₂ O _{bidest.}	1x	10 min
DNA-Transfer mit 20x SSC	1x	1 min

2.13.4. Hybridisierung der Sonde

Die Hybridisierung der biotinmarkierten Sonde erfolgte in einem Hybridisierungs-Ofen (Fa. Biometra, Göttingen). Hierfür wurde die Membran mit der DNA-tragenden Seite nach oben in ein 50 ml Reaktionsröhrchen gegeben und mit 25 ml Prähybridisierungslösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 68 °C in einem Hybridisierungsröhrchen (Fa. Ochs, Bovenden). Anschließend wurde dem Ansatz die Sonde zugegeben, die zuvor bei 98 °C für 5 min denaturiert wurde. Die Inkubation erfolgte weitere 16 h bei 68 °C. Um ungebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran anschließend zweimal mit Puffer P1 bei RT und zweimal mit Puffer P2 bei 68 °C gewaschen. Die Inkubationszeit für die einzelnen Waschschr- itte betrug in beiden Fällen 15 min.

Prähybridisierungslösung

20x SSC	12,5 ml
10% Blocking Stammlösung	5,0 ml
10% N-Laurylsarcosin	0,5 ml
10% SDS	0,1 ml
H ₂ O _{bidest.}	<i>ad</i> 50ml

Blocking Stammlösung (10%)

Blocking Reagent	10 g
Maleinsäurepuffer	<i>ad</i> 100 ml

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	0,1M
NaCl	0,15M
NaOH	0,175 M
H ₂ O _{bidest.}	<i>ad</i> 800ml

Puffer 1

20x SSC	80 ml
10% SDS	8 ml
H ₂ O _{bidest.}	<i>ad</i> 800ml

Puffer 2

20x SSC	4 ml
10% SDS	8 ml
H ₂ O _{bidest.}	<i>ad</i> 800ml

2.13.5. Kolorimetrische Detektion der Sonde

Die Detektion der biotinmarkierten Sonde erfolgte mit Hilfe des "Biotin Chromogenic Detection Kit" (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Ein Konjugat bestehend aus Streptavidin und einer alkalischen Phosphatase ermöglichte den Nachweis der Sonden-Ziel-DNA-Bindung, da das Streptavidin an das Biotin band. Die mit Streptavidin assoziierte alkalische Phosphatase konnte daraufhin das Substrat BCIP-T (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, p-Toluidine Salz) umsetzen, was zu einer Farbreaktion führte. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die dafür notwendigen Reagenzien lagen dem Kit bei.

2.14. DNA-Transfer in *E. coli* und Vertreter der Gattung *Bacillus*

2.14.1. Herstellung und Verwendung chemisch-kompetenter Zellen

Für die Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen wurden 10 ml LB-Medium mit 100 µl einer gut gewachsenen *E. coli* ÜN-Kultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen (Fa. Ochs, Bovenden) bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 - 0,6. Die Zellen wurden anschließend abgeerntet (6000 UpM, 10 min, 0 °C; Universal 320R, Fa. Hettich, Tuttlingen) und in eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) gewaschen. Nachdem die Zellen pelletiert worden waren, wurden diese in 1 ml CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert und mit 200 µl Glycerin (87 %) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen kurz auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden Plasmid-DNA erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 0 °C. Nachdem der Ansatz für 90 sek einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt worden war, schloss sich die Zugabe von 1 ml SOC-Medium an. Nach einer 45 minütigen Inkubation bei 37 °C zur Ausprägung der plasmidkodierten Marker, wurden die Zellen auf Selektivmedium ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.14.2. Elektroporation

Für die Elektroporation wurde in allen Fällen ein GenePulser II (Fa. Bio-Rad, München) verwendet.

2.14.2.1. Elektroporation in *E. coli*

Für die Elektroporation in *E. coli* wurde auf elektrokompetente Zellen *E. coli* TOP10 und DH10B (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) zurückgegriffen. Die elektrokompetenten Zellen wurden kurz auf Eis aufgetaut. 20 µl Zellsuspension wurden mit max. 2 µl DNA-Lösung versetzt. Ligationsansätze wurden zuvor mittels Dialyse auf einer Nitrocellulosemembran (Fa. Millipore, Billerica, USA) entsalzt. Der Elektroporationsansatz wurde schließlich in eine vorgekühlte, sterile Elektroporations-

küvette (Fa. Peqlab, Erlangen) überführt, die einen Elektrodenabstand von 1 mm aufwies. Es wurden folgende Bedingungen angelegt:

Spannung: 2,0 kV

Widerstand: 200 Ω

Kapazität: 25 μ F

Die Reaktionszeiten sollten in einem Bereich zwischen 4 und 5 msec liegen. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Selektivplatten ausgebracht.

2.14.2.2. Elektroporation in *Bacillus*

Für die Herstellung elektrokompetenter *Bacillus*-Zellen wurden 20 ml des Elektroporationsmediums mit 1 ml einer ÜN-Kultur angeimpft. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 60 - 100 min. Anschließend wurden die Zellen abgeerntet (6000 UpM, 10 min, 0 °C; Universal 320R, Fa. Hettich, Tuttlingen) und mit dem nachfolgend aufgeführten Elektroporationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden schließlich in 200 μ l des Elektroporationspuffers resuspendiert.

Elektroporationsmedium		Elektroporationspuffer	
Antibiotika Bouillon	1,75 g	Saccharose	0,625 M
Saccharose 2,5 M	20 ml	MgCl ₂	1mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml	pH 4 (HCl)	

Für die Elektroporation wurden 50 μ l kompetente Zellen mit max. 5 μ l DNA-Lösung gemischt. Der Ansatz wurde in Elektroporationsküvetten (Fa. Peqlab, Erlangen) mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführt. Es wurden folgende Bedingungen angelegt:

Spannung: 2,0 kV

Widerstand: 200 Ω

Kapazität: 25 μ F

Nach Zugabe des Regenerationsmediums (1 ml) erfolgte eine Inkubation für 3 h bei 30 °C. Anschließend wurde der Ansatz auf Selektivplatten ausplattiert.

Regenerationsmedium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Sorbitol 2,5 M	200 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Bei der Elektroporation von *B. licheniformis* H1 wurde ein ähnliches Protokoll verwendet. Die Zusammensetzung des Elektroporations-/Regenerationsmediums und des Elektroporationspuffers ist nachfolgend dargestellt.

Elektroporations- /Regenerationsmedium		Elektroporationspuffer	
Trypton	2 g	Saccharose	0,272 M
Hefeextrakt	1 g	MgCl ₂	1 mM
NaCl	1 g	KH ₂ PO ₄	7 mM
Saccharose 2 M	10 ml		
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml		

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie oben beschrieben im Elektroporations-/Regenerationsmedium. Nach der Ernte wurden die Zellen dreimal gewaschen und in 1/80 des Ausgangsvolumens resuspendiert. 100 µl elektrokompetente Zellen wurden mit maximal 5 µl DNA vermischt und unter folgenden Bedingungen elektroporiert.

Spannung: 1,2 V

Widerstand: 100 Ω

Kapazität: 50 µF

Im Anschluss wurde dem Ansatz 1 ml des Elektroporations-/Regenerationsmediums zugegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens 3,5 h bei 30 °C und 100 UpM. Im Anschluss wurde der Ansatz auf Festmediumplatten (Elektroporations-/Regenerationsmedium mit Antibiotikum) ausplattiert.

2.14.3. Konjugation

Für die Konjugation zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Organismen ist es notwendig, dass Plasmide einen "Origin of Transfer" (oriT) aufweisen (Pansegrau, et al., 1994). Als Donorstamm für die Konjugation wurde *E. coli* S17-1 verwendet (Simon, et al., 1983). Dieser Stamm besitzt Chromosom-integriert alle Gene, die für die Ausbildung der Konjugation notwendig sind.

Für die Konjugation wurden jeweils 500 µl Donor- und Akzeptorstamm-Zellsuspension aus einer ÜN-Kultur in je 10 ml frisches LB_{mod.}-Medium überimpft. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte bis zu einer OD_{600nm} von 1,2. Im Anschluss wurden 2 ml der Akzeptorzellsuspension abgenommen und abzentrifugiert (3000 UpM, 5 min, 4 °C; Heraus Fresco 17 Zentrifuge, Thermo Scientific, Waltham, USA). Das Pellet wurde einmal mit frischem LB_{mod.}-Medium gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde auf das Donorzellpellet 1 ml Akzeptorzellsuspension gegeben. Nachdem das Donorzellpellet resuspendiert worden war, wurde die Suspension abzentrifugiert und in einem Volumen von 200 µl LB_{mod.}-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde schließlich auf LB_{mod.}-Agarplatten ohne Selektionsdruck gegeben. Nach kurzem Antrocknen erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 30 °C. Im Anschluss wurde die Zellmasse mit LB_{mod.}-Medium abgeschwemmt und auf LB_{mod.}-Agarplatten mit Polymyxin B und Erythromycin bzw. Tetrazyclin ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C bis zum Auftreten erster Kolonien inkubiert, maximal aber 72 h. Durch die natürliche Resistenz Gram-positiver Bakterien gegenüber Polymyxin B konnte auf Vertreter der Gattung *Bacillus* selektiert werden. Erythromycin und Tetrazyclin dienten der Selektion auf das übertragene Plasmid. Für die Bestimmung der Donorzellzahlen wurden LB-Platten mit Erythromycin/Ampicillin oder Tetrazyclin verwendet.

2.15. Transposonmutagenese

In dieser Arbeit wurde eine Transposonmutagenese *in vitro* eingesetzt. Dabei fand das "EZ-Tn5™ <TET-1> Insertion Kit" (Fa. Epicentre, Madison, U.S.A) Anwendung. Es wurde vor allem dafür verwendet, um PCR-Produkte zu sequenzieren, die mit normalen Methoden, wie beispielsweise "Primer Walking", nicht sequenziert werden konnten. Hierfür mussten die PCR-Produkte zuerst kloniert werden (siehe 2.12).

Dieses System setzt sich aus einer Transposase und einem Transposon zusammen. Das Transposon beinhaltet ein Resistenz-Gen gegenüber Tetrazyklin. Für seinen Einsatz musste darauf geachtet werden, dass Transposon und Vektor-DNA im gleichen molaren Verhältnis eingesetzt wurden. Keinesfalls durfte die Menge des Transposons größer sein, da sonst Mehrfachintegrationen an Häufigkeit deutlich zunahmten. Nach der *in vitro*-Transposonmutagenese erfolgte eine Transformation in *E. coli* (siehe 2.14). Mit Hilfe der Marker des Vektors und des Transposons konnte erfolgreich auf Transposanten selektiert werden. Transposanten wurden durch Plasmid-Präparation und anschließendem Restriktionsverdau auf eine erfolgreiche Transposoninsertion in das Plasmid überprüft.

2.16. Erzeugen von Deletionen in *B. licheniformis*

Für die Generierung von markerfreien Deletionen in *B. licheniformis* wurde ein modifiziertes Protokoll nach Arnaud, et al., 2004 verwendet. Zu Beginn wurde eine Deletionskassette erzeugt, die aus den Deletionsbereich flankierenden Homologieregionen bestand. Für die Fusion der beiden Homologieregionen wurde eine SOE-PCR verwendet (siehe 2.10.2). Die Kassette wurde in einen temperatursensitiven Vektor kloniert und anschließend auf *B. licheniformis* übertragen. Für die Übertragung wurde neben Konjugation auch Elektroporation eingesetzt (siehe 2.14). Nachdem der Nachweis für einen erfolgreichen Transfer des Deletionsvektors erbacht worden war, wurde der entsprechende Klon in NB-Medium mit Selektionsdruck bei 30 °C angezogen. Darauf folgte eine Überimpfung des Klones in frisches NB-Medium mit Antibiotikum und eine Temperaturverschiebung auf 42 °C. Diese Temperatur verhinderte, dass der Vektor replizieren konnte. Die Vektoren, die in dieser Arbeit für die Erzeugung von Deletionen verwendet wurden, gehen auf den temperatursensitiven Vektor pE194ts zurück (Villafane, et al., 1987). Es handelt sich dabei um die Vektoren pMAD und pKVM1. Diesen Vektoren ist es ab einer Temperatur von 37 °C nicht mehr möglich in *Bacillus* zu replizieren. Diese Eigenschaft wurde verwendet, um auf eine Integration durch homologe Rekombination des Deletionsvektors zu selektieren. Im Anschluss an diese Anzucht wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die auf NB-Platten mit Glukose, X-Gal und entsprechendem Antibiotikum ausplattiert wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht ebenfalls bei 42 °C. Im Anschluss wurden blaue Klone ausgewählt, in NB-Medium ohne Selektionsdruck überimpft und bei 30 °C inkubiert. Dies ermöglichte dem Deletionsvektor in die freireplizierende Form zurückzukehren. Da dies durch ein

zweites Rekombinationsereignis erfolgte, konnte es zu einer Umkehrung des ersten Ereignisses oder zu einer Rekombination im zweiten homologen Bereich kommen. Passierte letzteres, verblieb die eingebrachte Deletionskassette im Chromosom und manifestierte die Deletion nach Verlust des Plasmides im Genom. Um entsprechende Deletionsmutanten zu identifizieren, wurde die Inkubation bei 30 °C ohne Selektionsdruck über mehrere Passagen hinweg vollzogen. Nach jeder Passage wurden Verdünnungsreihen erstellt, die auf NB-Platten mit Glukose und X-Gal ausplattiert wurden. Nach Inkubation bei 30 °C für maximal drei Tage zeigten sich weiße und blaue Kolonien. Die weißen Kolonien wurden gepickt und auf die Deletion überprüft. Für die Überprüfung wurde zuerst genomische DNA isoliert, auf der anschließend der Deletionsbereich per PCR amplifiziert wurde (siehe 2.9.4 und 2.10.1). Nach der Identifizierung der markerfreien Deletion wurde diese mittels Southernblot-Analyse verifiziert (siehe 2.12.4). Als Sonde wurde eine Flanke verwendet, die für die Erzeugung der Deletionskassette verwendet worden war.

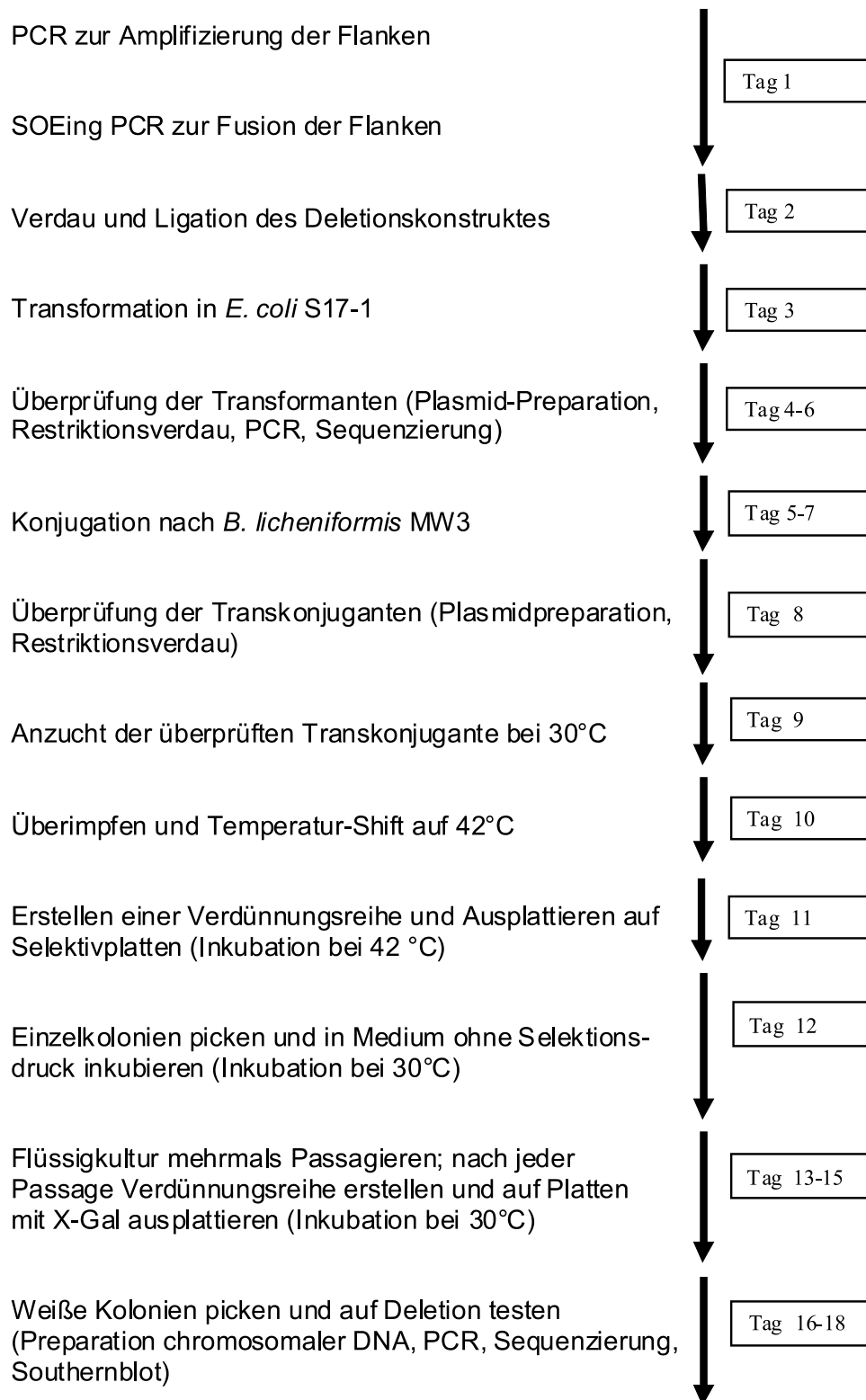


Abb. 2.3: Zeitschema für die Erzeugung einer Deletion in *B. licheniformis* MW3

2.17. Erstellen von Insertionen in *B. licheniformis*

Für die Erstellung einer Insertion wurde ebenso auf einen temperatursensitiven Vektor zurückgegriffen. Die dafür verwendete Insertionskassette setzte sich aus dem Insert und zwei flankierenden Bereichen zusammen, die den Integrationsort festlegten. Für die Konstruktion wurde auf eine Kombination aus Fusions-PCR und Hybridisierung zurückgegriffen (siehe 2.12.2). Der fertige Vektor wurde durch Konjugation auf *B. licheniformis* MW3 übertragen.

Die Erzeugung folgte dem gleichen Schema, wie bereits zuvor bei der Erzeugung von Deletionen (siehe 2.16) beschrieben.

2.18. Sequenzierung

Die Sequenzierung stellte eine wichtige Grundlage in dieser Arbeit dar. Sie wurde zum einen dafür eingesetzt, um Klonierungsexperimente und Mutationen zu verifizieren, aber auch um ein komplettes Genom zu sequenzieren.

Für die Verifizierung von Klonierungs- und Mutageneseexperimenten wurde die Sequenzierung nach Sanger, et al., 1977 verwendet. Diese fand ebenfalls Anwendung bei der Sequenzierung des Plasmids pKV12.

Für die Genomsequenzierung von *B. licheniformis* 9945A stand die 454-Technologie im Vordergrund (Margulies, et al., 2005).

2.18.1. Sequenzanalyse nach Sanger, et al., 1992

Diese Sequenziermethode beruht auf einem Kettenabbruch, der durch fluoreszenzmarkierte ddNTPs erfolgt (Sanger, et al., 1992). Diese werden anstelle eines dNTPs eingebaut und sorgen dafür, dass der Strang nicht weiter verlängert werden kann. Dadurch entstehen unterschiedlich große Fragmente, die je nach Art des ddNTPs eine spezifische Fluoreszenzmarkierung tragen. Für die Detektion wurde ein Kapillarsequenzierer 3730XL DNA Analyzer (Fa. ABI Applied Biosystems, Foster City, USA) eingesetzt.

2.18.2. 454-Sequenzierung

Für die Sequenzierung des Genomes von *B. licheniformis* 9945A wurde die 454-Sequenzierung eingesetzt (Margulies, et al., 2005). Diese Methode liefert in deutlich geringerer Zeit deutlich größere Datenmengen im Vergleich zur Methode nach Sanger (siehe 2.18.1). In diesem System wird die Strangsynthese in Echtzeit dokumentiert. Dies geschieht durch die Kopplung der Polymerisation der DNA-Stränge mit einem Luziferase-System. Die dadurch entstehenden Lichtblitze werden detektiert und als Sequenzinformation registriert. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Genome Sequencer FLX (Fa. Roche, Mannheim). Die daraus resultierenden Contigs wurden anschließend mit Hilfe des Skriptes „Fasta2exp.pl“ prozessiert. Die Contigs wurden dabei in 5000 bp-Partitionen unterteilt, die einen Überlapp von 1500 bp besaßen. Mit Hilfe dieses Überlappes wurden diese in Gap4 neu assembliert. Die Fragmentierung in 5000 bp-Abschnitte war notwendig, um zusätzliche Sequenzen aus einer Fosmid-Sequenzierung mit Hilfe der Phrep-Assemblierung in eine gemeinsame Datenbank zu integrieren (siehe 2.19). Für eine erfolgreiche Assemblierung benötigt Phrep Sequenzen bis maximal 5 kbp Länge (Staden, 1996, Staden, et al., 2000).

2.19. Lückenschluss

Für den Lückenschluss wurde auf PCR-basierte Methoden zurückgegriffen. Die Contigs wurden anhand von Fosmiden und einem Referenzgenom orientiert. Die Erstellung der Fosmid-Genbank erfolgte wie unter 2.12.4 beschrieben. Es wurden Klone gepickt, die Fosmide daraus isoliert und die Insertionen endständig sequenziert. Die daraus resultierenden Sequenzen wurden zusammen mit den prozessierten 454-Rohsequenzen durch eine Phrep-Assemblierung assembliert.

Die Sequenz des Referenzorganismus wurde in eine Gap4-Datenbank eingeladen und als Rückgrat für die Orientierung der Contigs verwendet. Es wurden Oligonukleotide an den Enden zweier zusammengehöriger Contigs abgeleitet und für eine PCR verwendet. Die Oligonukleotide wurden mit der bereits vorhandenen Genomsequenz abgeglichen, um deren Spezifität zu überprüfen. Lieferte die PCR ein eindeutiges Produkt, wurde der Ansatz aufgereinigt (siehe 2.9.6), ansonsten wurden die Banden mittels präparativer Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Gelextraktion aufgereinigt (siehe 2.9.5.2 und 2.9.7). Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung der PCR-Produkte nach Sanger, et al., 1992. Hierfür wurden die zuvor

verwendeten PCR-Oligonukleotide verwendet. Falls es notwendig war, wurden weitere Oligonukleotide abgeleitet, um die komplette Sequenz des DNA-Fragmentes zu ermitteln. Die daraus resultierenden Sequenzen wurden in den Datensatz eingeladen und für den Lückenschluss verwendet.

Sekundär-Strukturen in der DNA sollten durch Zugabe von Detergenzien (DMSO, Betain) aufgelöst werden. War eine vollständige Sequenzierung der PCR-Produkte aufgrund von Sequenzwiederholungen nicht möglich, wurden diese subkloniert. Hierfür fand eine TOPO XL Klonierung Anwendung (siehe 2.12.3). Da die PCR-Produkte mit Hilfe des PCR Extender Systems erzeugt wurden und die verwendete DNA-Polymerase ein Gemisch aus Taq-Polymerase und "Proofreading"-Polymerasen darstellt, konnte auf Anfügen von 3'-Adenosinüberhängen verzichtet werden. Das erhaltene PCR-Produkt stellte ein Gemisch aus Produkten mit und ohne 3'-Adenosinüberhängen dar und konnte daher nach einem Aufreinigungsschritt direkt für die TOPO-XL-Klonierung verwendet werden. Der Klonierungsansatz wurde in elektrokompetente *E. coli* TOP10 transformiert. Die Suche nach dem erwarteten Insert erfolgte durch Plasmidpräparation (siehe 2.9.3). Das Plasmid mit dem entsprechenden Insert wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung mit den Oligonukleotiden ABI1 und ABI2 identifiziert. Im Anschluss erfolgte eine Transposonmutagenese wie unter 2.15 beschrieben. Dies wurde *in vitro* mit einem zufällig inserierenden Transposon durchgeführt. Der Ansatz wurde anschließend in *E. coli* TOP10 transformiert (siehe 2.14). Die Selektion erfolgte auf Basis der Resistenzen gegenüber Kanamycin (pCR®-XL-TOPO®) und Tetrazyklin (EZ-Tn5™ <TET-1>). Die daraus resultierenden Sequenzen wurden in den Datensatz eingeladen. Anhand von punktuellen Unterschieden wurden diese angeordnet und für den Lückenschluss verwendet.

2.20. Qualitätsverbesserung

Bereiche innerhalb der Lücken wiesen in vielen Fällen auch nach dem Lückenschluss nicht die notwendige Abdeckung und Sicherheit auf. Dies machte es notwendig, weitere Sequenzen in diesen Bereichen zu ermitteln, bis eine zweifache Abdeckung und ein Qualitätswert von 45 erreicht wurden.

Einen weiteren Punkt der Qualitätsverbesserung stellte die Überprüfung von Leserahmenverschiebungen dar. Nach der automatischen ORF-Vorhersage und der anschließenden Annotation lagen manche Gene auf zwei ORFs verteilt vor. Diese Leserahmenverschiebung kann auf einen Fehler in der Sequenzierung bzw. As-

semblierung hindeuten. In diesen Fällen wurden die entsprechenden Sequenzen näher betrachtet. Ging die Leserahmenverschiebung auf einen Fehler in der Assemblierung zurück, fand eine neue Assemblierung statt. Deuteten die Sequenzläufe auf einen potentiellen Sequenzierfehler hin, wurden Oligonukleotide abgeleitet, der Bereich per PCR auf genomischer DNA als Matrize amplifiziert und anschließend sequenziert.

2.21. Annotation

Nachdem alle Sequenzlücken geschlossen worden waren, begann die Annotation. Diese bestand darin, dass alle potentiellen Gene identifiziert wurden und ihnen, wenn möglich, eine Funktion zugewiesen wurde.

2.21.1. ORF-Vorhersage

Eine Voraussetzung für den Beginn der Annotation war die Identifizierung aller potentiellen offenen Leserahmen ("Open reading frame" - ORF). Hierfür wurde das Programm YACOP (Tech and Merkl, 2003) verwendet, das die Programme GLIMMER, ZCurve und Critica miteinander kombiniert (Badger and Olsen, 1999, Delcher, et al., 1999, Guo, et al., 2003). Mit Hilfe des Programms tRNAscan-SE wurden tRNAs bestimmt (Lowe and Eddy, 1997).

Die durch YACOP identifizierten ORFs wurden auf ihre korrekte Länge mit Hilfe des Programmes Artemis überprüft (Rutherford, et al., 2000). Kriterien dafür waren zum einen das Vorhandensein einer Ribosomen-Bindestelle in Form von AGGAGG unmittelbar vor dem Startcodon ATG, zum anderen eine einheitliche "Codon-Usage", die in Form des "GC Frame Plots" dargestellt wurde.

2.21.2. BiBaG

Das Programm BiBaG ("Bidirectional blast for identification of Bacterial pan and core genomes") wurde für den Vergleich eines Ausgangsorganismus mit einer unbegrenzten Anzahl von Vergleichsorganismen auf Basis der proteinkodierenden Gene entwickelt (Antje Wollherr, persönliche Kommunikation). Es soll dazu dienen, orthologe Gene zwischen zwei Organismen zu identifizieren. Dabei kommt ein bidirektionaler Blast zur Anwendung, bei dem in erster Instanz durch Ermittlung des

ersten Blast-Treffers allen Genen im Ausgangsorganismus Orthologe im Vergleichsorganismus zugeordnet werden. In zweiter Instanz wird dann überprüft, ob die identifizierten orthologen Gene aus dem Vergleichsorganismus mittels Blast auf ihre Orthologen im Ausgangsorganismus zeigen. War dies der Fall, wurden diese als tatsächlich ortholog angesehen, wenn nicht als Falsch-Positive aussortiert.

Des Weiteren wurde das Programm BiBaG auch zur Annotation von *B. licheniformis* 9945A eingesetzt. Da Vertreter der Gattung *Bacillus* sehr eng miteinander verwandt sind und deswegen auch auf Nukleotide- und Proteinebene hohe Übereinstimmungen aufweisen, wurden Referenzorganismen ausgewählt, mit denen orthologe Gene identifiziert und deren Annotation anschließend auf die entsprechenden Gene in *B. licheniformis* 9945A übertragen wurde.

Eine erweiterte Form der BiBaG-Analyse stellt die Triple-BiBaG-Analyse dar. Dabei wird die Genaustattung dreier Organismen miteinander verglichen. Basierend auf einzelnen BiBaG-Analysen wird die Anzahl der Gene bestimmt die nur in einem, nur in zwei oder allen Organismen gefunden werden können. BiBaG-Analysen werden jeweils für jeden Organismus gegen die anderen beiden Organismen durchgeführt.

2.21.3. Identifizierung von Fremdgenen

Für die Identifizierung von Fremdgenen wurde das WEB-basierte Programm "Island Viewer" eingesetzt (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>). Dieses Programm kombiniert die Programme "SIGI-HMM", "IslandPath-DIMOB" und "IslandPick" (Hsiao, et al., 2003, Langille, et al., 2008, Waack, et al., 2006). "SIGI-HMM" und "IslandPath-DIMOB" nutzten die Codon-Benutzung, um potentielle "Genomic Islands" zu identifizieren. Im Gegensatz dazu verwendet "IslandPick" Genome phylogenetisch verwandter Organismen, um eine Vorhersage von "Genomic Islands" in dem untersuchten Genom durchzuführen.

2.21.4. Manuelle Annotation

Für die manuelle Annotation wurde das Programm ERGO eingesetzt (Fa. Integrated Genomics, Arlington Heights, USA) (Overbeek, et al., 2003). Nachdem die Annotationsübertragung aus der BiBaG-Untersuchung abgeschlossen worden war, wurden alle ORFs, denen auf diese Weise keine Funktion zugewiesen werden

konnte, einer manuellen Annotation unterzogen. Hierfür wurde speziell nach Ähnlichkeiten zu experimentell untersuchten Proteinen gesucht. Zu den ORFs wurden über die in die ERGO-Benutzeroberfläche eingebunden Hilfsprogramme und externen Links Zusatzinformationen eingeholt. Zu den intern genutzten Programmen gehörten Sequenz-Vergleiche auf Basis der Nukleotid- und AS-Sequenz und Clustervergleiche mit Hilfe der Funktion "contig regions". Als Referenz diente eine lokale Genom-Datenbank, die insgesamt 485 Referenzorganismen enthielt. Einen weiteren Punkt stellten externe Sequenzvergleiche mittels BLAST in den Datenbanken TrEMBL und Swiss-Prot dar (<http://www.uniprot.org>). Dabei wurden Treffer in der Swiss-Prot-Datenbank stärker gewichtet als in der TrEMBL-Datenbank. Swiss-Prot enthält Einträge, die manuell überprüft wurden, während Einträge in TrEMBL größtenteils auf eine automatische Annotation zurückgehen. In Swiss-Prot findet auch eine Einteilung der Einträge auf ihre Aussagekraft statt. Untersuchungen auf Proteinebene führen zu einem Eintrag mit höchster Aussagekraft, während vorhergesagte Funktionen und Funktionen auf Basis von Homologien einen niedrigeren Stellenwert einnehmen. Für Domänenuntersuchungen wurden die Programme Interpro und NCBI CD-Search verwendet (Hunter, et al., 2009, Marchler-Bauer, et al., 2005).

3. Ergebnisse

3.1. DNA-Transfer in *B. licheniformis*

In den letzten 10 Jahren hat es eine deutliche Zunahme in der Zahl der sequenzierten Genome gegeben (<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/index.php>). Die Genomsequenzierung ist zu einem allgemeinen Werkzeug in der Molekularbiologie geworden und eröffnete damit molekularbiologischem Arbeiten neue Möglichkeiten in der Stammuntersuchung. Durch gezielte Deletionen, aber auch durch Übertragung von Genen und Genclustern, lassen sich neue optimierte Stämme erzeugen, die für biotechnologische Anwendungen von großem Interesse sind.

Der Modellorganismus *B. subtilis* 168 lässt sich leicht und schnell transformieren. Dies ist vor allem auf seine hohe natürliche Kompetenz zurückzuführen (Anagnostopoulos and Spizizen, 1961, Spizizen, 1958). *B. licheniformis* DSM13, ein naher Verwandter von *B. subtilis*, ist dagegen nur sehr schlecht transformierbar. Aufgrund seiner niedrigen natürlichen Kompetenz muss für diesen Organismus auf andere Methoden zurückgegriffen werden. Derzeit wird hierfür vorwiegend die Transformation von Protoplasten eingesetzt (Chang and Cohen, 1979, Harwood and Cutting, 1990). Es handelt sich dabei um eine arbeitsaufwendige Methode, die eine schlechte Reproduzierbarkeit besitzt (Harwood and Cutting, 1990). Elektroporation und speziell auch Konjugation stellen hierfür gute Alternativen dar.

3.1.1. Etablierung eines Elektroporationsprotokolls für *B. licheniformis* MW3

Elektroporation stellt eine schnelle und effiziente Methode dar, um in eine Vielzahl von Organismen DNA zu transformieren. Für die Etablierung eines reproduzierbaren Elektroporationsprotokolls für *B. licheniformis* MW3 wurden verschiedene Protokolle getestet (Dunny, et al., 1991, Tangney, et al., 1994, Xue, et al., 1999). Alle drei getesteten Protokolle lieferten in ersten Versuchen keine Transformanten. Auf Basis des Protokolls nach Dunny, et al., 1991 wurde eine Anpassung an *B. licheniformis* MW3 vorgenommen. Dazu gehörten der Test verschiedener Anzuchtmedien (NB und Antibiotika Bouillon) und der Einsatz unterschiedlicher osmo-

tisch-stabilisierender Substanzen (Sorbitol und Saccharose), sowohl im Anzucht- als auch im Regenerationsmedium. Es stellte sich heraus, dass durch die Kombination von PAB und Saccharose im Anzuchtmedium und die osmotische Stabilisierung des Regenerationsmediums durch Sorbitol erste Transformanten nachgewiesen werden konnten (Daten nicht aufgeführt). Basierend auf diesen Beobachtungen wurden Wachstumskurven erstellt, bei denen zu verschiedenen Punkten Proben entnommen wurden, um für Elektroporationsversuche herangezogen zu werden (siehe Abb. 3.1). Für die Elektroporation wurde der Vektor pMAD verwendet, da dieser zu diesem Zeitpunkt als zentrales Werkzeug für die Mutagenese von *B. licheniformis* Stämmen angesehen wurde (Arnaud, et al., 2004).

Es wurden mit Hilfe des unter 2.14.2.2 beschriebenen Protokolls elektrokompetente Zellen hergestellt. Nach der Elektroporation erfolgte die Detektion der Transformanten und letztlich die Bestimmung der Elektroporationseffizienzen, die in der Anzahl der Transformanten pro μg eingesetzter DNA angegeben wurden. Die Werte der Transformationseffizienz schwankten zwischen 23 und 280 Transformanten/ μg DNA, weshalb an dieser Stelle auf einen Durchschnittswert verzichtet wurde. Transformanten wurden zufällig gepickt und auf Plasmid-DNA überprüft.

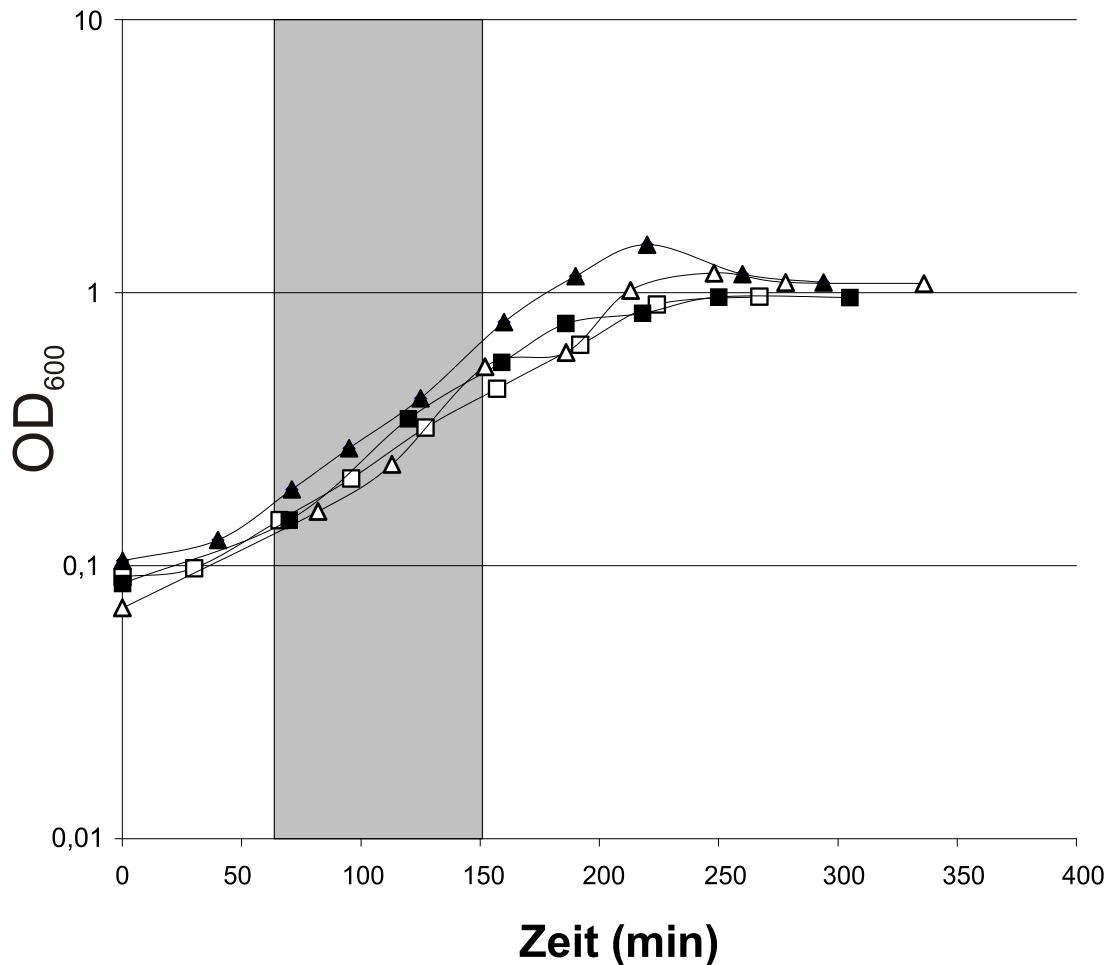


Abb. 3.1: Wachstumskurven von unterschiedlichen *B. licheniformis* MW3 Kulturen (▲, △, ■, □) in Elektroporationsmedium: grau unterlegter Bereich kennzeichnet den Bereich, in dem Transformanten detektiert werden konnten.

In Abb. 3.1 sind vier ausgewählte Wachstumskurven von *B. licheniformis* MW3 zu sehen. Der grau unterlegte Bereich gibt den Zeitraum an, in dem Transformanten detektiert werden konnten. Die durchschnittliche Generationszeit der vier Wachstumskurven betrug $58 \pm 5,4$ min. Für alle vier Wachstumskurven konnten Transformanten nach ca. einer Generation nach Inokulation detektiert werden. Für den standardmäßigen Einsatz der Elektroporation für *B. licheniformis* MW3 wurde eine Inokulation auf eine OD_{600} von 0,1 und eine Inkubation bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,2 festgelegt, was einem Zeitraum von ca. 60 min entspricht.

3.1.2. Vektoren für die Konjugation

Für die Etablierung eines Protokolls zur Übertragung von Plasmid-DNA nach *B. licheniformis* MW3 mittels Konjugation wurden zu Beginn Plasmide auf ihre

Übertragbarkeit nach *B. licheniformis* MW3 getestet. Dazu gehörten pKV12 und pLS30 (Sakaya, et al., 2006, Strätz, et al., 1994). Transkonjuganten lieferte lediglich der Vektor pKV12, der bereits erfolgreich bei *A. woodii* DSM 1030, *B. subtilis* DSM 402 und *E. faecalis* JH2-2 verwendet worden war (Strätz, et al., 1994). Da für diesen Vektor keine Sequenz vorlag, erfolgte im Anschluss eine Sequenzanalyse.

Die Isolation des Vektors pKV12 erfolgte mittels Plasmidpräparation aus *E. coli*. Die Plasmid-DNA wurde, wie unter 2.9.8 beschrieben, geschert, um Fragmente in einer Größe von 3 kbp zu erzeugen. Anschließend wurde die mechanisch gescheerte DNA durch Erzeugung von glatten Enden (siehe 2.11.3) und Anfügen von 3'-Adenosinüberhängen (siehe 2.11.4) für die nächsten Schritte vorbereitet. Sowohl nach der Erzeugung der glatten Enden als auch nach dem Anfügen der 3'-Adenosinüberhängen erfolgte eine Aufreinigung der DNA (siehe 2.9.6). Der Ansatz wurde für eine TOPO-TA-Klonierung herangezogen (siehe 2.12.3) und in elektrokompetente *E. coli* TOP10 transformiert (siehe 2.14.2.1). Nach der Transformation wurde der Ansatz auf LB mit Ampicillin, X-Gal und IPTG ausgebracht. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Weiße Kolonien wurden überimpft und für eine Plasmidpräparation herangezogen. Die Vektoren wurden im 96er Maßstab isoliert und für eine endständige Sequenzierung der Insertionsfragmente herangezogen. Die dafür verwendeten Oligonukleotide waren ABI1 und ABI2 (siehe Tab. A1), deren Anlagerungsstellen stromaufwärts und stromabwärts außerhalb der Insertionen auf der Vektorsequenz lagen. Insgesamt wurden 192 Klone hierfür herangezogen. Die Sequenzen wurden in Gap4 eingeladen und durch die Phrep-Funktion assembliert (Staden, 1996, Staden, et al., 2000). Das Ergebnis der Sequenzierung und der Sequenzanalyse des Vektors pKV12 ist in Abb. 3.2 dargestellt.

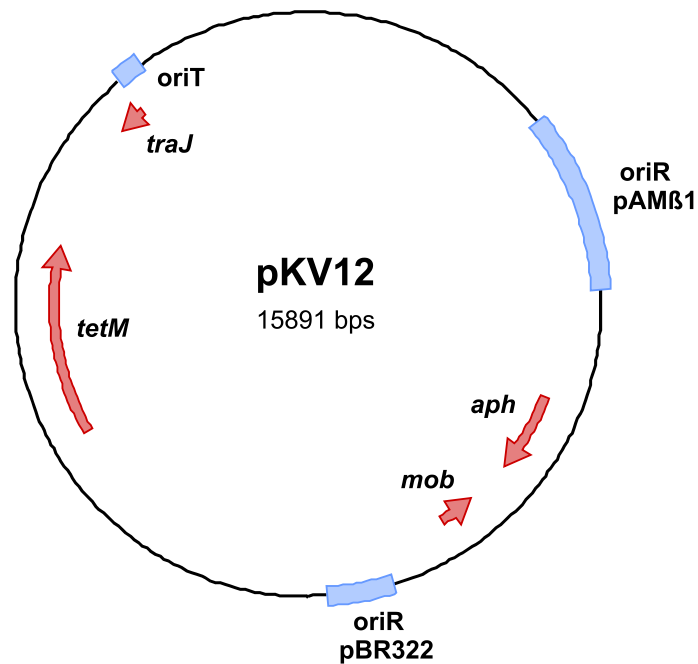


Abb. 3.2: Plasmid-Karte des Vektors pKV12 nach Abschluss der Sequenzierung: rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid, blaue Kästen Regionen für die Replikation (oriR) und Konjugation (oriT).

Die Charakteristika des Vektors sind seine beiden Replikationsursprünge, die es ihm ermöglichen als "Shuttle"-Vektor zu fungieren. Der Replikationsursprung oriR pBR322 stammt ursprünglich aus dem *E. coli* Plasmid pBR322, während oriR pAM β 1 aus dem Plasmid pAM β 1 stammt, das zur Replikation in *Bacillus*-Spezies befähigt ist. Darüber hinaus besitzt pKV12 Resistenzgene gegen Kanamycin (*aph*) und Tetrazyklin (*tetM*). Eine weitere Eigenschaft, die für die nachfolgenden Arbeiten von Interesse war, stellt seinen Ursprung für den konjugativen Transfer (oriT) dar. Der oriT ist der Bereich, in den der Einzelstrangbruch eingefügt wird, der als Ausgangspunkt für die Konjugation verwendet wird (Pansegrau, et al., 1994). Der oriT ist hier mit dem Gen *traJ* assoziiert, dessen Genprodukt eine wichtige Rolle in der Initiation des DNA-Transfers spielt. oriT und *traJ* gehen auf das Plasmid RP4 zurück (Pansegrau, et al., 1994). Für die weiteren Arbeiten wurde auf die hier ermittelte Sequenz zurückgegriffen.

Für die in dieser Arbeit geplanten Mutageneseexperimente benötigte man Systeme, in denen unter kontrollierten Bedingungen das freireplizierende Plasmid nach der Mutagenese entfernt werden kann. Der Vektor pKV12 liefert diese Voraussetzung im Gegensatz zu dem Vektor pMAD nicht. Der Vektor pMAD basiert auf dem temperatursensitiven Plasmid pE194ts, einer mutagenisierten Variante des aus

Staphylococcus aureus isolierten Plasmids pE194 (Arnaud, et al., 2004, Villafane, et al., 1987). Dieser Vektor besitzt darüber hinaus eine β -Galaktosidase, die das "Screening"-Verfahren während der Mutagenese deutlich vereinfacht. Basierend auf diesem Plasmid wurden konjugative Vektoren für die Mutagenese erzeugt (pKVM-System).

Für eine schnelle und effiziente Erzeugung einer Mutation in *B. licheniformis* benötigt man auch ein ebensolches DNA-Transfer-System. Konjugation stellt hierfür die Methode der Wahl dar, vor allem im Hinblick auf die Verwendung in nicht oder nur gering natürlich kompetenten Stämmen. Um den Vektor pMAD für die Konjugation zu mobilisieren, wurde der *oriT* und das dazugehörige *traJ* Gen aus pKV12 in den Vektor pMAD kloniert. Hierfür wurden die Oligonukleotide Kon1 und Kon2 verwendet (siehe Tab. A1), mit deren Hilfe dieser Bereich mit pKV12 als Matrize amplifiziert wurde. Den beiden Oligonukleotiden wurden *KasI*-Schnittstellen angefügt, damit das Amplifikat in die *KasI*-Schnittstelle des Vektors pMAD kloniert werden konnte (siehe Abb. 3.3). Der daraus resultierende Vektor pKVM1 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft (Daten nicht aufgeführt).

Um das Anwendungsspektrum zu erweitern, wurden ferner Varianten von pKVM1 erzeugt, die über ein Tetrazyklin-Resistenzgen verfügen. Hierfür wurde auf die Tetrazyklin-Resistenzkassette (*tetM*) aus pKV12 zurückgegriffen. Diese Resistenz stammt ursprünglich aus dem Transposon Tn916 (Bertram, et al., 1991). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass diese Resistenz ein breites Anwendungsspektrum besitzt. Für die Amplifikation des *tetM*-Genes wurden die Oligonukleotide Tet1 und Tet2 verwendet (siehe Tab. A1). Dem Oligonukleotid Tet1 wurde eine *XbaI*-, dem Oligonukleotid Tet2 eine *SalI*-Schnittstelle angefügt. Das Amplifikat wurde in den Vektor pKVM1 integriert. Hierfür wurde der Vektor in zwei verschiedenen Varianten durch PCR mit den Oligonukleotidpaaren Vec1/Vec3 und Vec2/Vec3 amplifiziert. Den Oligonukleotiden Vec1 und Vec2 wurden *SpeI*-Schnittstellen angefügt, während Vec3 eine zusätzliche *XhoI*-Schnittstelle erhielt. Die Restriktionsenzyme *XbaI* und *SpeI* produzieren ebenso wie die Restriktionsenzyme *SalI* und *XhoI* kompatible Enden, so dass durch die Klonierung keine weiteren Restriktionsschnittstellen erzeugt wurden. Die Klonierung wurde durch Restriktionsverdau, PCR und Sequenzierung bestätigt.

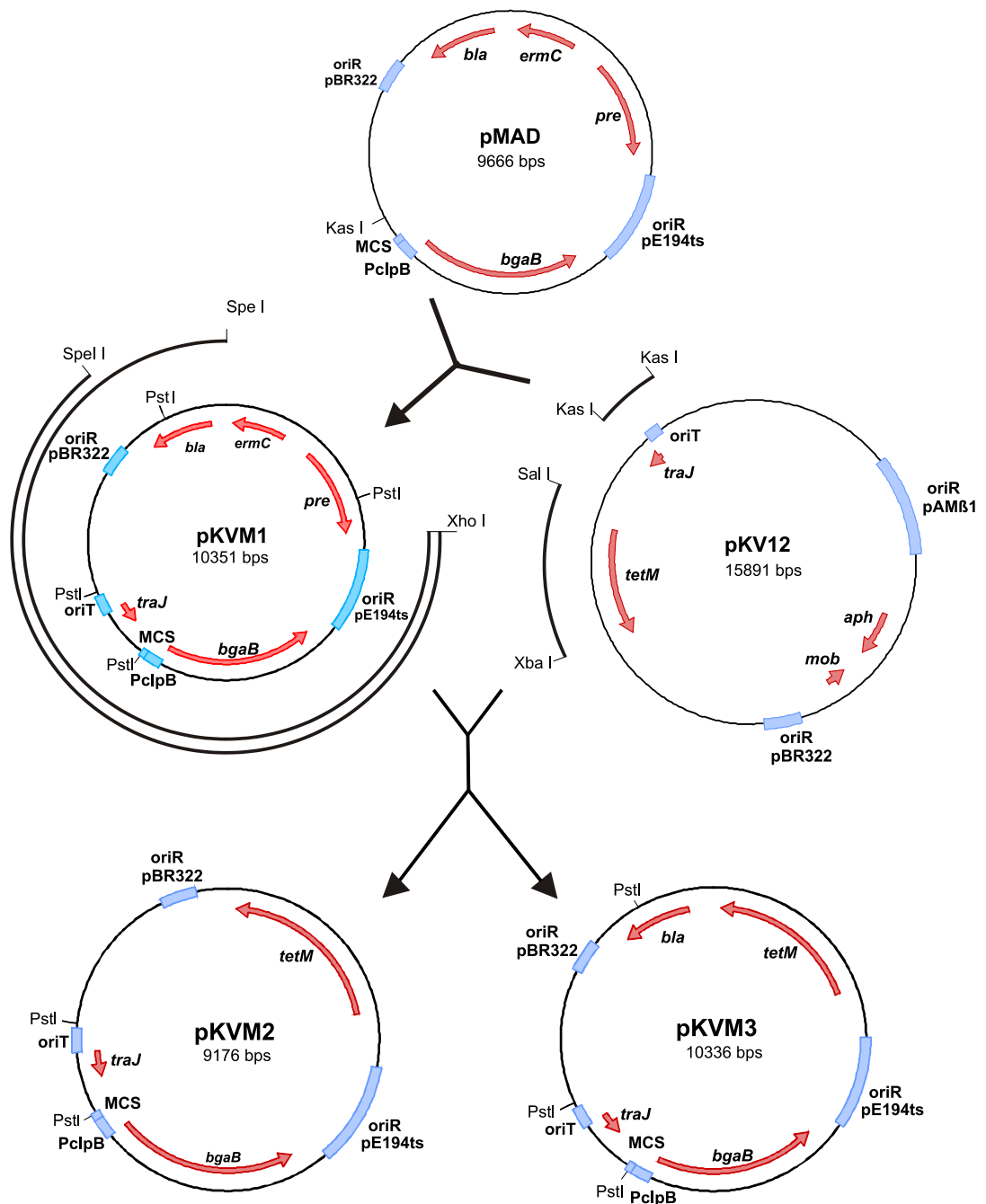


Abb. 3.3: Fliessschema zur Konstruktion der Vektoren pKVM1-3: rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid, blaue Kästen Regionen für die Replikation (oriR), Konjugation (oriT) und Promotorbereiche (PclpB); Restriktionsschnittstellen sind mit einem Verweis auf ihre Position angegeben; schwarze Linien über den Plasmidkarten geben den Bereich der PCR-Amplifikation wieder; bei den Restriktionsschnittstellen an den Rändern der PCR-Amplifikate handelt es sich um Schnittstellen, die den Oligonukleotiden angefügt wurden.

Eine Übersicht der Erzeugung der Vektoren pKVM2 und pKVM3 ist in Abb. 3.3 dargestellt. Die Plasmide wurden anschließend auf ihre konjugative Übertragbarkeit getestet. Alle Vektoren der pKVM-Reihe konnten erfolgreich auf *B. licheniformis*

MW3 übertragen werden. Für Mutagenese-Experimente konnte ab diesem Zeitpunkt auf Vektoren mit Resistenzen gegen Ampicillin und Erythromycin, Ampicillin und Tetrazyklin und einem Vektor mit lediglich einer Resistenz gegen Tetrazyklin zurückgegriffen werden.

Im Anschluss sollte ermittelt werden, in welcher Höhe eine konjugative Übertragung nach Vertretern der Gattung *Bacillus* möglich ist. Es wurden jeweils zwei *B. subtilis*- und *B. licheniformis*-Stämme herangezogen. Die Konjugation erfolgte wie unter 2.14.3 beschrieben. Als Donorstamm für die Konjugation wurde *E. coli* S17-1 verwendet (Simon, et al., 1983). Dieser besitzt eine Chromosomen integrierte Version des Plasmides RP4-2(Tc::Mu). Die Plasmide pKVM1 und pKVM2 konnten mit einer Effizienz von $0,79 \times 10^{-5} \pm 0,75$ und $2,2 \times 10^{-7} \pm 0,6$ Transkonjuganten pro Donorzellen auf *B. licheniformis* MW3 übertragen werden (siehe Tab. 3.1). Die Effizienz für den Vektor pKVM1 war dabei 35-fach höher als für pKVM2.

Tab. 3.1: Konjugationseffizienzen für den DNA-Transfer der Vektoren pKVM1 und pKVM2 von *E. coli* S17-1 nach *B. licheniformis* MW3, *B. licheniformis* 9945, *B. subtilis* DSM402 und *B. subtilis* NCIB3610.

Rezipient	Anzahl der Transkonjuganten pro Donorzellzahl
	(<i>E. coli</i> S17-1 pKVM1)
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3	$0,79 \cdot 10^{-5} \pm 0,75$
<i>Bacillus subtilis</i> 168	$1,6 \cdot 10^{-6} \pm 2,0$
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB3610	$3,6 \cdot 10^{-6} \pm 0,3$
	(<i>E. coli</i> S17-1 pKVM2)
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3	$2,2 \cdot 10^{-7} \pm 0,6$
<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A	$8,7 \cdot 10^{-8} \pm 3,1$

Der Vektor pKVM1 konnte auf die *B. subtilis* Stämme 168 und NCIB3610 mit Effizienzen von $1,6 \times 10^{-6} \pm 2,0$ und $3,6 \times 10^{-6} \pm 0,3$ übertragen werden. Die Konjugation des Vektors pKVM2 auf den Erythromycin-resistenten *B. licheniformis* 9945A zeigte eine Effizienz von $2,2 \times 10^{-7} \pm 0,6$. Dieser Wert entspricht nur zu einem Viertel der Konjugationseffizienz des Vektors pKVM2 nach *B. licheniformis* MW3. Der Vektor pKVM3 wurde lediglich in Einzelexperimenten auf seine konjugative Übertragbarkeit getestet. Da in der Spezies *B. licheniformis* Erythromycin-Resistenz gehäuft

vorkommt (Ishihara, et al., 2002), sind die Vektoren pKVM2 und pKVM3 eine gute Ergänzung für Mutagenese-Experimente in *B. licheniformis*.

3.1.3. *in vivo*-Methylierung

Neben *B. licheniformis* MW3 stellte *B. licheniformis* H1 einen der Hauptarbeitsstämme in dieser Arbeit dar. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen Produktionsstamm der Firma Henkel. Im Zuge dieser Arbeit sollten für diesen Stamm Methoden für den DNA-Transfer etabliert werden, die eine einfache und effiziente Übertragung ermöglichen. Die unter 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Methoden erzielten für diesen Stamm kein Ergebnis.

RM-Systeme schützen die Zelle vor fremder DNA, in dem sie nicht oder falsch methylierte DNA hydrolysieren. RM-Systeme setzen sich aus einer Nuklease und einer DNA-Methyltransferase zusammen, die normalerweise kolokalisiert auftreten (Wilson and Murray, 1991). Restriktionsenzyme können oft sequenzbasiert nicht direkt identifiziert werden, da es sich um eine sich schnell entwickelnde Gruppe von Genen handelt, die in den meisten Fällen kaum Sequenzähnlichkeiten zueinander aufweisen (Roberts, et al., 2010). Bei der Suche nach potentiellen RM-Systemen fand daher eine Fokussierung auf die Identifizierung von DNA-Methyltransferasen statt. Da DNA-Methyltransferasen konservierte Bereiche besitzen, die eine deutlich einfachere Identifizierung möglich machen (Cheng and Roberts, 2001), wurde eine Suche nach potentiellen DNA-Methyltransferasen im Genom von *B. licheniformis* H1 durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Untersuchung des genetischen Umfeldes dieser Kandidaten. Die entsprechenden Gene wurden einer Sequenzanalyse unterzogen und auf Nuklease-Sequenzmotive untersucht. Dadurch konnten zwei potentielle RM-Systeme im Genom von *B. licheniformis* H1 identifiziert werden (siehe Abb. 3.4).

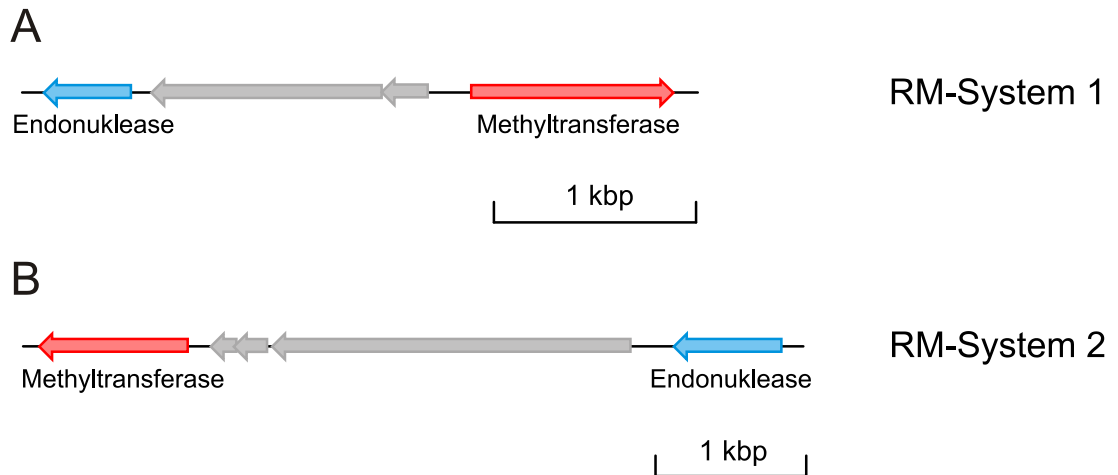


Abb. 3.4: Genetische Organisation der RM-Systeme aus *B. licheniformis* H1: Gene sind als Pfeile gekennzeichnet, die die Leserichtung wiedergeben; DNA-Methyltransferasen sind als rote Pfeile, potentielle Endonukleasen als blaue Pfeile gekennzeichnet.

Beide RM-Systeme weisen eine ähnliche Organisation auf, da die Restriktionsenzyme von den DNA-Methyltransferasen durch weitere ORFs voneinander getrennt vorliegen (siehe Abb. 3.4). Die Sequenzanalysen deuteten darauf hin, dass es sich um TypII-RM-Systeme handelt. Bei TypII-RM-Systemen treten im Gegensatz zu TypI und TypIII-Systemen die Nuklease und die DNA-Methyltransferase nicht in einem Komplex auf (Roberts, et al., 2003, Wilson and Murray, 1991). Die DNA-Methyltransferase des RM-Systems 1 besitzt auf Proteinebene Sequenzähnlichkeit zu einer cytosinspezifischen Modifikationsmethyltransferase aus *Bacillus cereus* AH820 (Lubys and Janulaitis, 1995). Die Identität liegt dabei bei 70 % auf Aminosäureebene. Die DNA-Methyltransferase des RM-Systems 2 besitzt dagegen eine Identität in Höhe von 66 % zu einer Modifikationsmethyltransferase aus *Listeria monocytogenes* FSL J1-194, die in diesem Organismus nicht näher charakterisiert wurde. Sequenzvergleiche der DNA-Methyltransferase 2 deuteten auf eine Cytosin-Spezifität des Enzyms hin. Die beiden potentiellen Restriktionsenzyme besitzen nur Identitäten von 61 % und 41 % zu einem als Endonuklease annotierten Enzym aus *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 (Endonuklease des RM-Systems 1) und einem als HNH-Endonuklease annotierten Enzym aus *Bacteroides* sp. D1 (Endonuklease des RM-Systems 2). Beide Proteine sind in den entsprechenden Organismen nicht näher charakterisiert. Die beiden DNA-Methyltransferasen konnten aufgrund ihrer Sequenzhomologien eindeutig als DNA-Modifikations-

methyltransferasen identifiziert werden. Für die beiden potentiellen Endonukleasen war dies nicht möglich.

RM-Systeme stellen in den meisten Fällen eine massive Barriere für den DNA-Transfer dar. Eine Methode diese Barriere zu umgehen, stellt eine *in vivo*-Methylierung der DNA dar, die für DNA-Transfer-Experimente verwendet wird. TypII-RM-Systeme eignen sich hierfür besonders, weil die DNA-Methyltransferase keinen Komplex mit der entsprechenden Nuklease bildet und die Spezifität nicht von einer weiteren Untereinheit abhängig ist (Roberts, et al., 2003).

Das DNA-Methyltransferase-Gen des RM-Systems 2 aus *B. licheniformis* H1 wurde zusammen mit seinem potentiellen Promotorbereich mit den Oligonukleotiden Met1 und Met2 amplifiziert. Durch angefügte *Nco*I und *Bam*HI-Schnittstellen an die verwendeten Oligonukleotide war es möglich das PCR-Amplifikat in den Vektor pColA-Duet1 zu klonieren (siehe Abb. 3.5). Dieser Vektor wurde wegen seiner zwei unterschiedlichen "Multiple Cloning Sites" verwendet. Das daraus resultierende Plasmid pIMV1 (siehe Abb. 3.5) wurde durch Restriktionsverdau, PCR und Sequenzierung identifiziert und für ein weiteres Klonierungsexperiment verwendet.

Das Methyltransferase-Gen des RM-Systems 1 aus *B. licheniformis* H1 sollte ebenfalls durch PCR-Amplifikation, Restriktionsverdau und anschließender Ligation in diesen Vektor kloniert werden. Trotz wiederholter Versuche bei unterschiedlichen Bedingungen und Verwendung verschiedener *E. coli*-Stämme konnte das gewünschte Ergebnis nicht erzielt werden. Spätere Versuche offenbarten für Methyltransferase 1 eine Inkompatibilität mit *mrr* und *mcrABC*-positiven Stämmen. Darüber hinaus führte auch bei Verwendung von *mrr* und *mcrABC*-negativen Stämmen eine Klonierung nicht zu dem gewünschten Ergebnis.

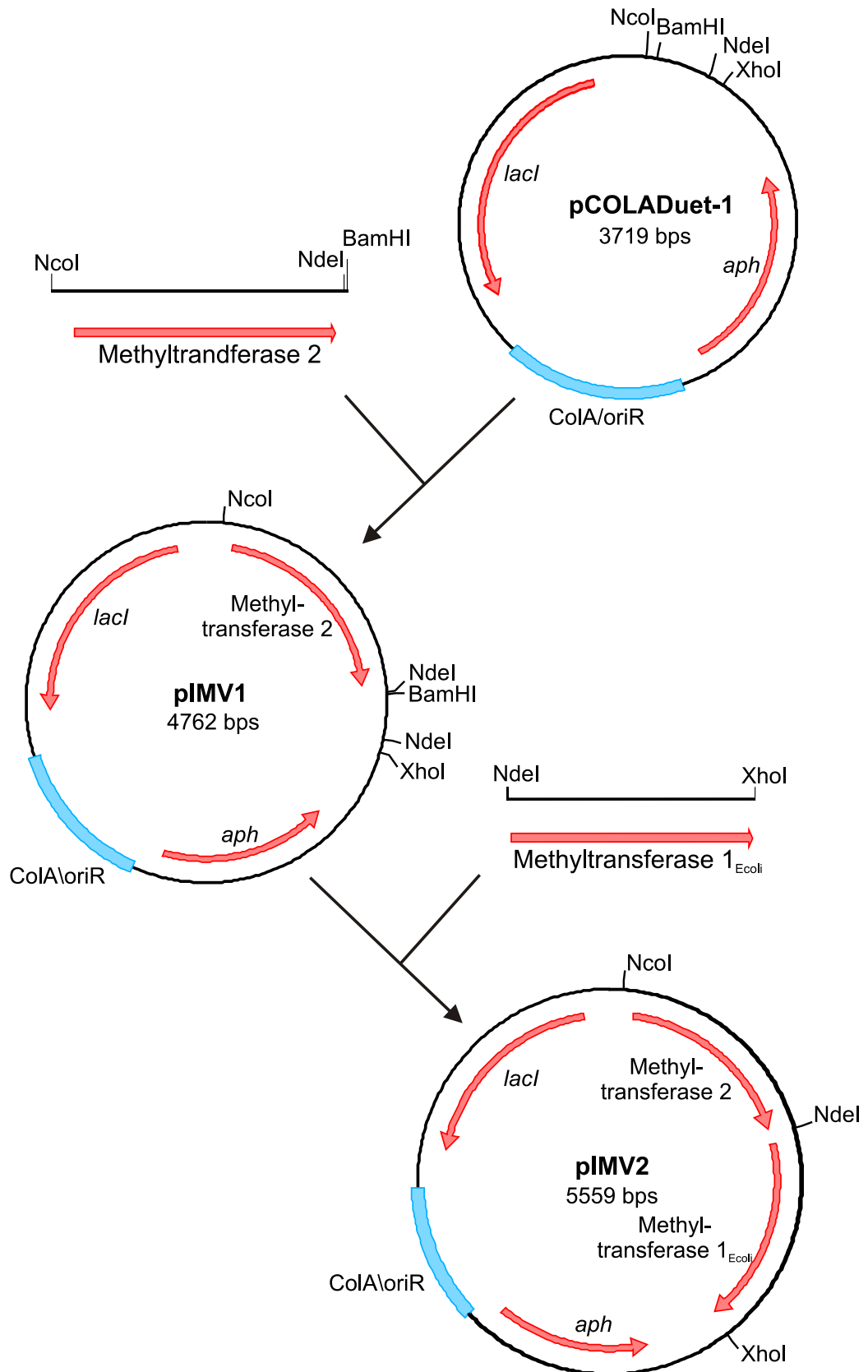


Abb. 3.5: Fließschema zur Konstruktion der Vektoren pIMV1 und pIMV2: rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid, blaue Kästen Regionen für die Replikation (*oriR*) und Konjugation (*oriT*); Restriktionsschnittstellen sind mit einem Verweis auf ihre Position angegeben.

Um die Klonierbarkeit des DNA-Methyltransferase 1-Gens zu verbessern, wurde die Sequenz an die Codon-Nutzung aus *E. coli* angepasst. Dies geschah durch Neusynthese des Gens durch die Fa. Geneart (Regensburg). Das Gen mit einer an *E. coli* angepassten Codon-Nutzung wurde als DNA-Methyltransferase 1_{Ecoli} bezeichnet und wurde im Vektor pMA Methyltransferase 1_{Ecoli} geliefert. Dieses Gen wurde mit den Oligonukleotiden Met3 und Met4 per PCR amplifiziert, wobei pMA Methyltransferase 1_{Ecoli} als Matrize verwendet wurde. Oligonukleotid Met3 wurde um eine *NdeI*-Schnittstelle verlängert, während dies bei Oligonukleotid Met4 nicht nötig war, da sich direkt an das Stopcodon des DNA-Methyltransferase-Gens eine *XhoI*-Schnittstelle anschloss. Über diese Schnittstellen im Amplifikat und im Vektor pIMV1 fand die Klonierung statt (siehe Abb. 3.5). Das Ergebnis war der Vektor pIMV2 mit dessen Hilfe das Methylierungsmuster von *B. licheniformis* H1 in *E. coli* erzeugt werden sollte.

Nach der Konstruktion wurden die Vektoren pIMV1 und pIMV2 für die *in vivo*-Methylierung des Vektors pKVM1 eingesetzt. Zu Beginn des Versuches wurde pIMV1 zusammen mit pKVM1 in *E. coli* S17-1 eingebracht. Bei *E. coli* S17-1 handelt es sich um einen Stamm, der die Gene für eine Konjugation zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien zur Verfügung stellt (Simon, et al., 1983). Im Anschluss erfolgten Konjugationsversuche mit *B. licheniformis* H1. Die Konjugation wurde, wie unter 2.14.3 beschrieben, durchgeführt. Dabei konnten erste Transkonjuganten detektiert werden, die im Gegensatz zum Ausgangsstamm eine Erythromycinresistenz aufwiesen. Eine Negativ-Kontrolle ohne den *in vivo*-Methylierungsvektor lieferte keine Transkonjuganten. Die Erythromycin-resistenten Klone wurden daraufhin auf das Auftreten des Plasmids pKVM1 mittels Plasmidpräparation untersucht (siehe 2.9.3). Im Laufe dieser Untersuchung konnte kein freies Plasmid nachgewiesen werden, was auf eine Restriktion mit anschließendem Abbau des Plasmides schließen ließ (Daten nicht aufgeführt).

Das Plasmid pIMV2 sollte ebenfalls in den Konjugationsstamm *E. coli* S17-1 transformiert werden. Es stellte sich heraus, dass das Plasmid nicht in *E. coli*-Stämme transformiert werden kann, die methylierungsabhängige Endonukleasen (McrABC/Mrr) besitzen. Die vorliegenden Konjugationsstämme besitzen entweder intakte *mcrABC* und *mrr* Gene oder Antibiotikaresistenzen, die ebenfalls von Genen auf den verwendeten Plasmiden vermittelt wurden. Daher wurde für den DNA-Transfer nach *B. licheniformis* H1 ab diesem Zeitpunkt auf Elektroporation zurückgegriffen. Die *in vivo*-Methylierung erfolgte in *E. coli* TOP10, einem *mcrABC* und *mrr* negati-

ven Stamm. Die Elektroporation wurde, wie unter 2.14.2.2 beschrieben, durchgeführt. Transformanten konnten daraufhin detektiert werden, die im Anschluss auf das Plasmid pKVM1 mittels Plasmidpräparation und Restriktionsverdau überprüft wurden (siehe 2.9.6 und 2.11.1). Die Transformanten besaßen ebenso, wie die nach der Konjugation mit durch pIMV1 methyliertem pKVM1-Vektor detektierten Transkonjuganten, eine ausgeprägte Erythromycin-Resistenz. Das Ergebnis der Plasmidpräparation ist in Abb. 3.6 dargestellt.

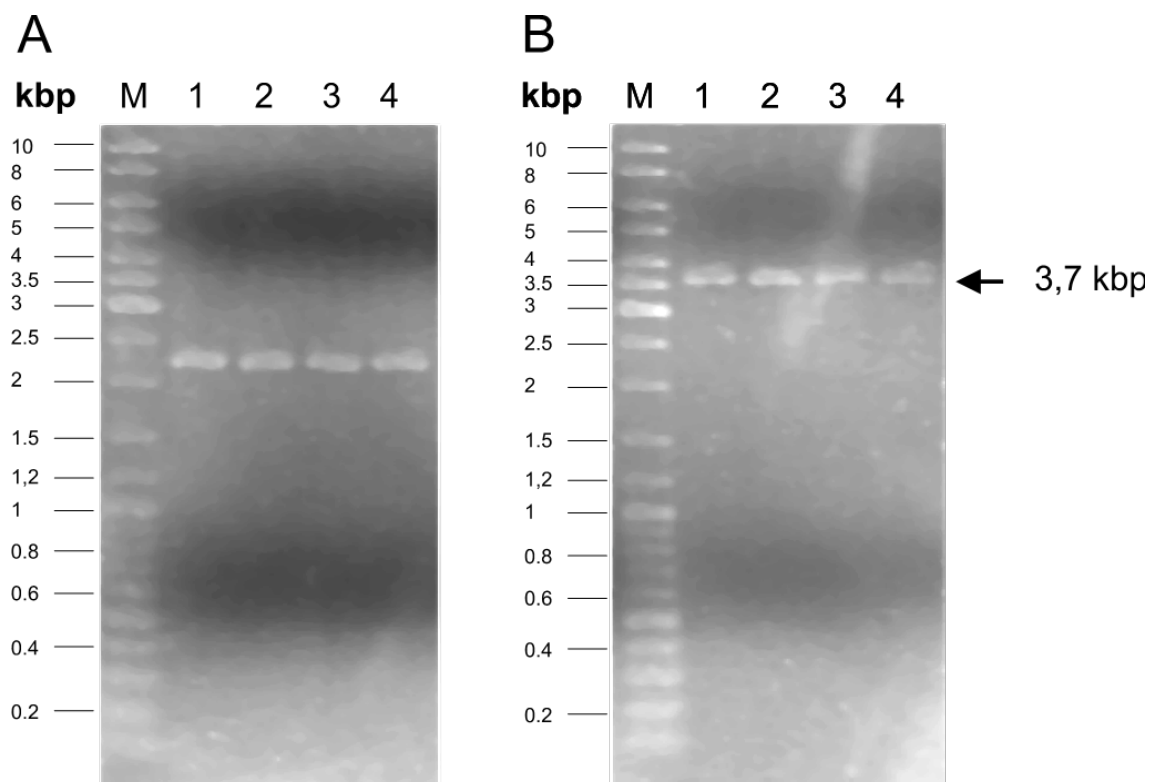


Abb. 3.6: **A** Elektrophoretische Auftrennung der Plasmid-Präparationen der Transformanten 1-4 aus der Elektroporation *B. licheniformis* H1 mit *in vivo*-methylierten Vektor pKVM1; **B** *Pst*I-Verdau der Plasmidpräparationen aus A.

In Abb. 3.6 ist zu sehen, dass ein Plasmid nachgewiesen werden konnte, das eine Größe von ca. 3,7 kbp aufwies. Der Vektor pKVM1 besitzt dagegen eine Größe von 10,3 kbp (siehe 3.1.2). Da das nachgewiesene Plasmid deutlich kleiner als der Vektor pKVM1 war, wurde davon ausgegangen, dass eine weitere Barriere in *B. licheniformis* H1 die DNA-Aufnahme behindert. Da es sich bei *E. coli* TOP10 um einen *dam* und *dcm* positiven Stamm handelt, wiesen alle bisher übertragenen Plasmide zusätzliche Methylierungsmuster auf. *Dam* vermittelt Methylierung von Adenosin in GATC-Motiven, während *Dcm* Cytosine in CCWGG-Motiven methyliert

(Geier and Modrich, 1979, Gomez-Eichelmann, et al., 1991). Um Plasmide zu erzeugen, die ausschließlich *B. licheniformis* H1 Methylierung aufweisen, wurde *E. coli* INV110 für alle weiteren *in vivo*-Methylierungsversuche verwendet (Fa. Invitrogen, Karlsruhe). Die Besonderheiten dieses Stammes liegen vor allem darin, dass er sowohl *dam*- und *dcm*- als auch *mcrABC* und *mrr*-negativ ist. Da als Hypothese eine Dam- oder Dcm-Methylierung als Ursache für die gescheiterte Elektroporation angesehen wurde, wurde ab diesem Zeitpunkt pMAD als Transformationsvektor verwendet. Das Plasmid pKVM1 besitzt besonders viele Dcm-Sequenzmotive im Bereich des *oriT/traJ* (siehe Abb. 4.1). Darüber hinaus wurde für eine Elektroporation kein *oriT* zur konjugativen Übertragung benötigt. Die Plasmide pIMV2 und pMAD Δ Bh02419 wurden zusammen in diesen Stamm transformiert. Statt des ursprünglichen Plasmids pMAD wurde bereits pMAD mit einer Deletionskassette gegen das Gen Bh02419 verwendet (siehe 3.2.2). Das Plasmidgemisch der Vektoren pIMV2 und pMAD Δ Bh02419 wurde für die Elektroporation von *B. licheniformis* H1 verwendet. Die daraus resultierenden Transformanten wiesen ebenso eine deutliche Erythromycin-Resistenz auf und wurden anschließend auf ein intaktes freireplizierendes Plasmid mittels Plasmidpräparation und Restriktionsverdau untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 3.7 dargestellt.

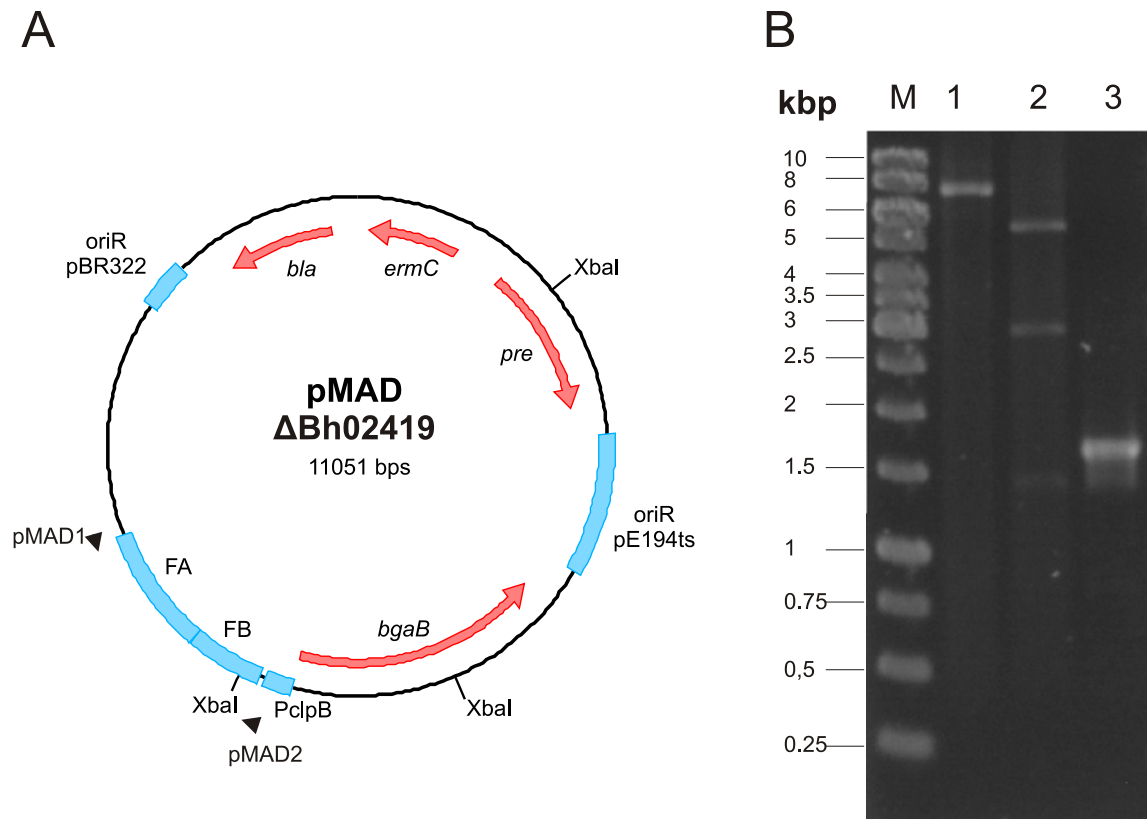


Abb. 3.7: Nachweis des Plasmides pMAD Δ Bh02419 in *B. licheniformis* StammH1: **A** Plasmid-Karte des Vektors pMAD Δ Bh02419 mit den Restriktionsschnittstellen für *Xba*I; schwarze Pfeile kennzeichnen die Anlagerungsstellen der aufgeführten Oligonukleotide; **B** Elektrophoretische Auftrennung einer Plasmidpräparation des Plasmides pMAD Δ Bh02419 aus *B. licheniformis* H1 (Spur 1), eines Restriktionsverdau mit dem Enzym *Xba*I (Spur 2) und der PCR auf pMAD Δ Bh02419 unter Verwendung der Oligonukleotide pMAD1 und pMAD2 (Spur 3).

Die Übertragung des Plasmids konnte durch *Xba*I-Restriktionsverdau verifiziert werden. Des Weiteren konnte auch die Deletionskassette mittels PCR und Sequenzierung nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Oligonukleotide pMAD1 und pMAD2 verwendet (siehe Abb. 3.7). Die Elektroporation wurde dreimal wiederholt. In allen Fällen konnten Transformanten detektiert werden, die das intakte Plasmid pMAD Δ Bh02419 enthielten. Somit konnte gezeigt werden, dass durch *in vivo*-Methylierung und Verwendung eines *dam* und *dcm*-negativen Klonierungsstammes die RM-Barriere in *B. licheniformis* H1 umgangen werden konnte. Mit Hilfe dieses Plasmids sollte eine markerfreie Deletion erzeugt werden (siehe 3.2.2).

3.2. Markerfreie Deletion in *B. licheniformis*

Für die Erzeugung von Organismen mit einer optimalen Genomausstattung sind Methoden für die Erstellung von markerfreien Deletionen unabdingbar. Durch eine markerfreie gerichtete Mutagenese können beliebig viele Deletionen in unterschiedlichen Größen erzeugt werden. Vor allem für die biotechnologische Nutzung ist es wichtig, Stämme zu erzeugen, die keine Resistenzen gegenüber Antibiotika aufweisen.

Das pKVM-System kann durch Konjugation auf Zielstämme für die Mutagenese übertragen werden (siehe 3.1.2). Aufgrund seines temperatursensitiven Replikationsursprungs eignet es sich sehr gut für die Mutagenese und für die Erzeugung markerfreier Deletionen.

3.2.1. Deletion des PBSX-orthologen Phagen in *B. licheniformis* MW3

Im Genom von *B. licheniformis* DSM13 stellen vor allem Phagen variable Bereiche dar, die in Fermentationsprozessen nicht benötigt werden oder diese zum Teil auch behindern. Einer dieser Phagen ist der PBSX-orthologe Phage mit einer Größe von ca. 28 kbp im Genom von *B. licheniformis* DSM13 (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004).

Bacillus subtilis Spezies und einige seiner nächsten Verwandten besitzen einen oder mehrere defekte Phagen (Haas and Yoshikawa, 1969, Huang and Marmur, 1970, Qiu, et al., 2004). In *B. subtilis* 168 wird dieser als PBSX bezeichnet. Es handelt sich dabei um einen defekten Phagen, der anstatt seines eigenen Genoms Teile des Wirtsgenoms in seine Phagenpartikel integriert (Anderson and Bott, 1985).

B. licheniformis DSM13 besitzt vier potenzielle Prophagen inklusive eines PBSX-orthologen Phagen (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004). Um festzustellen, welche Phagenbereiche tatsächlich aktiv sind, wurden Induktionsversuche durchgeführt. Für die Induktion wurde Mitomycin C verwendet. Mitomycin C interkaliert in den DNA-Doppelstrang und führt zu einer kovalenten Bindung zwischen den beiden Strängen, was letztlich einen letalen Effekt auf die Zelle hat (Paz, et al., 2004). Um die Lethalitätsgrenze des Mitomycin C zu bestimmen, wurde zu Beginn der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen dieses Toxins auf eine Kultur von

B. licheniformis DSM13 getestet. Hierfür wurde *B. licheniformis* DSM13 in LB_{mod.} bei 37 °C und 150 UpM über Nacht angezogen und am darauffolgenden Tag überimpft. Die Kulturen wurden mit 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml und 10 µg/ml Mitomycin C versetzt. Als Referenz diente eine Kultur, der kein Mitomycin C zugegeben wurde.

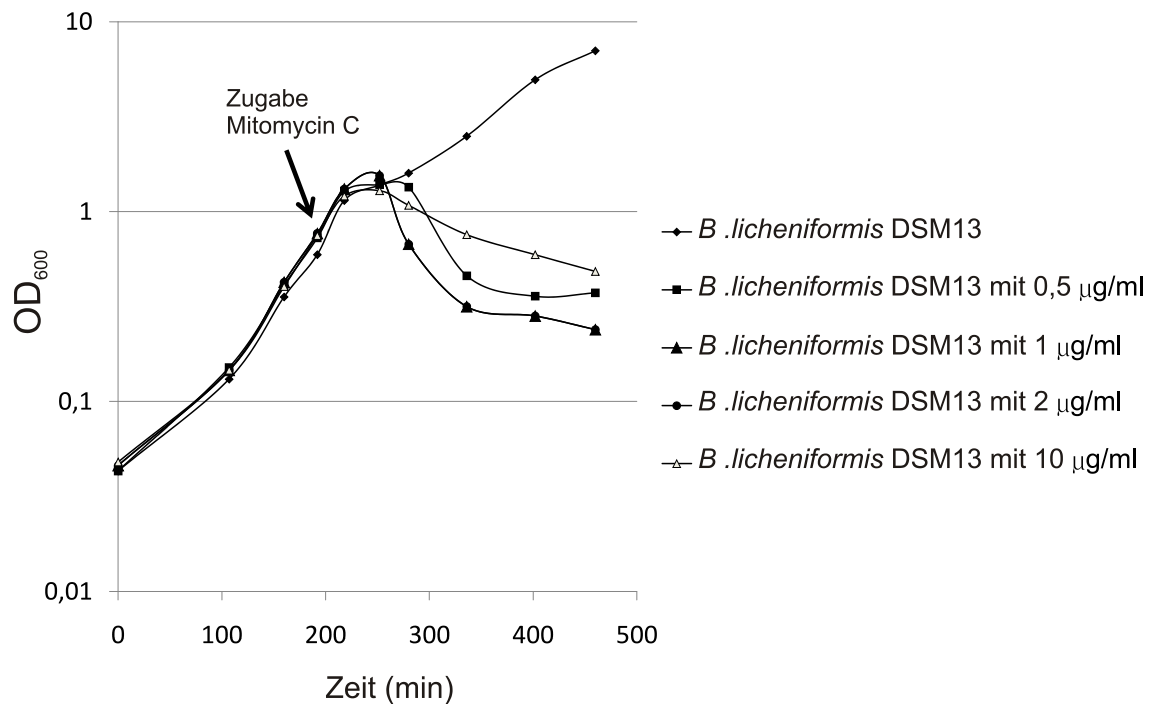


Abb. 3.8: Wachstumskurven von *B. licheniformis* DSM13 mit unterschiedlichen Mitomycin C Konzentrationen: *B. licheniformis* DSM13 Kulturen wurden in LB_{mod.}-Medium bei 37 °C und 150 UpM angezogen; es wurden verschiedene Mitomycin C-Konzentrationen (0, 0,5, 1, 2 und 10 µg/ml) getestet; Pfeil markiert den Zeitpunkt der Induktion mit Mitomycin C.

In Abb. 3.8 sind deutliche Abnahmen in der optischen Dichte der *B. licheniformis* DSM13 Kulturen zu verzeichnen, die mit Mitomycin C versetzt wurden. Die größte Abnahme war bei Zugabe von 1 µg/ml und 2 µg/ml Mitomycin C zu beobachten. Bei 10 µg/ml war eine geringere Abnahme der optischen Dichte als bei 1 und 2 µg/ml Mitomycin C-Zugabe zu erkennen, was vermutlich auf die Toxizität des Mitomycin C zurückgeht. Zugabe von 0,5 µg/ml Mitomycin C zeigte einen deutlich geringeren Effekt als die Zugabe von 1 und 2 µg/ml Mitomycin C. Ohne Zugabe von Mitomycin C war keine Abnahme der optischen Dichte im Wachstumsverlauf zu verzeichnen, wobei bei einem Wert von 1 eine Diauxie zu verzeichnen war. Für spätere Induktionsversuche wurde daher erst nach dieser Diauxie induziert, um

einen Zusammenfall der Diauxie mit der Abnahme der optischen Dichte in Folge Miotmycin C-Zugabe zu verhindern.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden jeweils zwei Kolben mit frischem LB_{mod.} mit einer ÜN-Kultur von *B. licheniformis* MW3 auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und anschließend schüttelnd bei 150 UpM und 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 3,0 erfolgte die Phageninduktion in einer der beiden Kulturen mit 2 µg/ml Mitomycin C.

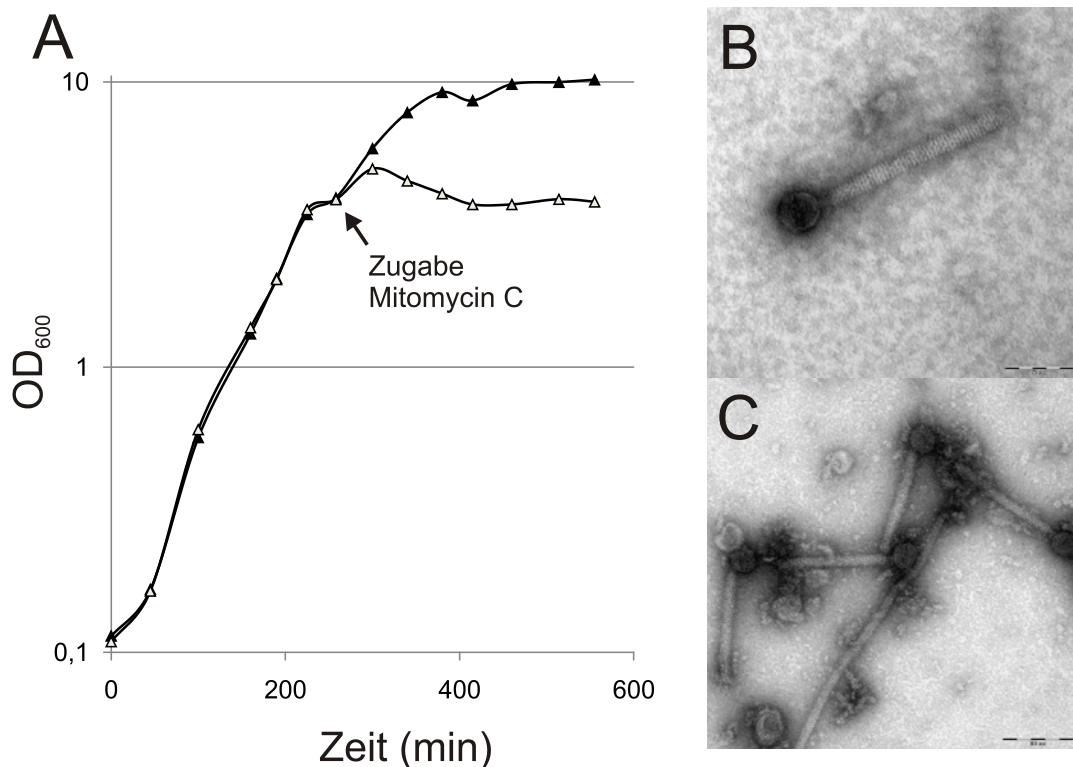


Abb. 3.9: Phageninduktion in *B. licheniformis* MW3: **A** Wachstumskurven zweier *B. licheniformis* MW3 Kulturen ohne Induktion (▲) und mit Induktion (Δ) durch Mitomycin C in LB_{mod.}-Medium bei 37 °C und 150 UpM; Pfeil markiert den Zeitpunkt der Induktion; **B/C** elektronenmikroskopische Untersuchung der Überstände nach der Induktion mit Mitomycin C.

Beide Wachstumskurven nahmen bis zur Induktion einen ähnlichen Verlauf (siehe Abb. 3.9 A). Lediglich nach Induktion einer der beiden Kulturen mit Mitomycin C war eine deutliche Abnahme in der optischen Dichte zu verzeichnen, während für die Kultur ohne Zugabe von Mitomycin C keine Abnahme zu beobachten war. Obwohl die Kultur in Abb. 3.9 bei einer deutlich höheren OD₆₀₀ induziert wurde als in Abb. 3.8, war keine höhere Abnahme in der optischen Dichte zu erkennen.

Im Anschluss an die Phageninduktion erfolgte eine Zentrifugation bei 6000 g und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen und für die Anreicherung von Phagenpartikel (siehe 2.7) verwendet.

Die Proben wurden anschließend mit Uranylacetat negativkontrastiert und elektronenmikroskopisch untersucht (siehe 2.8). Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Hoppert. Das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Untersuchung ist in Abb. 3.9: B und C dargestellt. Es konnten Phagenpartikel identifiziert werden, die sich aus Kopf, Schwanz und Schwanzhüllprotein zusammensetzten. Darüber hinaus konnten vesikelähnliche und lange fädige Strukturen identifiziert werden.

Für die Deletion des PBSX-orthologen Phagens in *B. licheniformis* MW3 wurden zu Beginn der Arbeit die genomischen Grenzen des Phagens bestimmt. Durch Vergleiche der Genorganisation des PBSX-orthologen Phagen aus *B. licheniformis* DSM13 mit orthologen Bereichen anderer Vertreter der Gattung *Bacillus* wurde die Größe der Deletion festgelegt. Der Deletionsbereich erstreckte sich von Gen Bli01316 bis Bli01353. Die Gene Bli01314 und Bli01315 kommen im Genom von *B. licheniformis* DSM13 in ähnlicher Form ein weiteres Mal vor. Da dieser Bereich als Homologieregion für die Erstellung einer Deletionskassette nicht geeignet war, wurde der Deletionsbereich um diese beiden ORFs erweitert, so dass sich dieser von Bli01314 bis Bli01353 erstreckte. Letztlich sollte ein Bereich von 31 kbp aus dem Genom von *B. licheniformis* MW3 entfernt werden. Anhand dieser Einteilung wurden Flankenbereiche festgelegt, die für die Erzeugung einer Deletionskassette verwendet wurden. Die Oligonukleotide PBSX2 und PBSX3 fanden für die Amplifikation der Flanke A und die Oligonukleotide PBSX4 und PBSX5 für die Amplifikation der Flanke B Anwendung. Deren Positionen wurden so gewählt, dass durch die Deletion keine neuen ORFs entstanden. Den Oligonukleotiden PBSX2 und PBSX5 wurden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *NcoI* und *EcoRI* angefügt, während die Oligonukleotide PBSX3 und PBSX4 die invers komplementäre Sequenz des jeweils anderen Oligonukleotids als Anhang erhielten. Die Anlagerungsstellen der Oligonukleotide sind in Abb. 3.10 dargestellt.

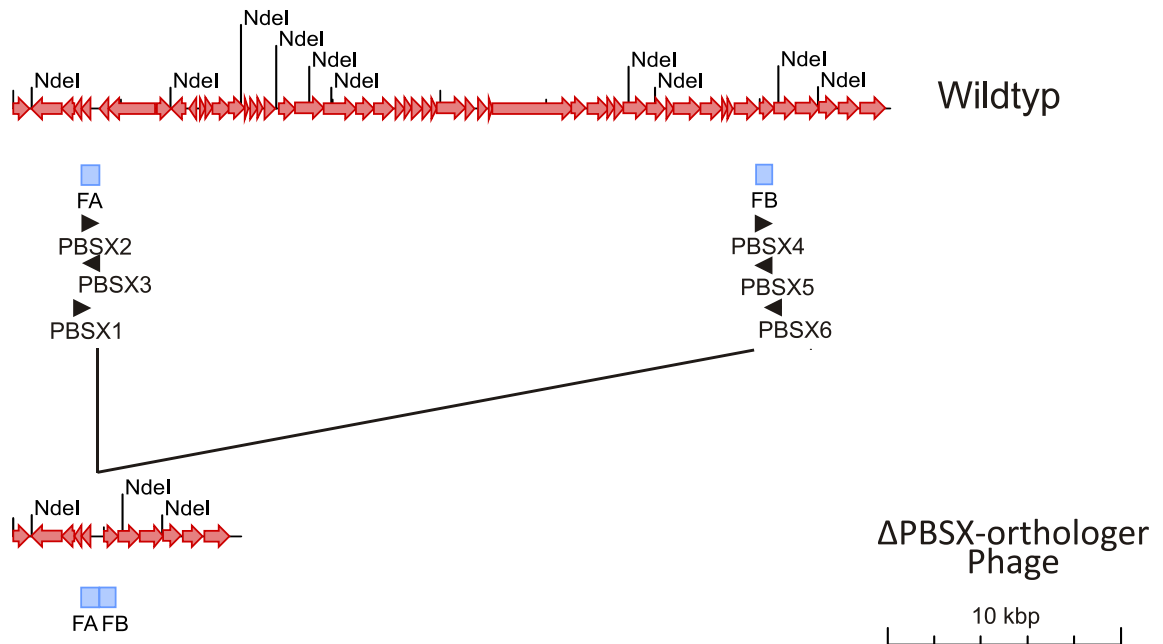


Abb. 3.10: Übersicht über die Erzeugung der Deletion im Bereich des PBSX-orthologen Phagen in *B. licheniformis* MW3: rote Pfeile kennzeichnen Gene in ihrer Leserichtung; schwarze Pfeile Anlagerungsstellen der verwendeten Oligonukleotide; blaue Kästen die Bereiche, die für die Erzeugung der Deletionskassette verwendet wurden; Restriktionsschnittstellen sind mit einem Verweis auf ihre Position angegeben.

Die Fusion der Flanken A und B erfolgte durch eine SOE-PCR (siehe 2.10.2). Die Deletionskassette wurde über die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Eco*RI in pKVM1 kloniert und in den Stamm *E. coli* S17-1 transformiert. Im Anschluss erfolgte die Konjugation in den Stamm *B. licheniformis* MW3, wie unter 2.14.3 beschrieben. An den Nachweis der erfolgreichen Übertragung des Deletionsvektors schloss sich die Erzeugung der Deletion im Genom von *B. licheniformis* MW3 an (siehe 2.16). Der PCR-basierte Nachweis der Deletion erfolgte mit Hilfe der Oligonukleotide PBSX1 und PBSX6 (siehe Abb. 3.10) auf genomischer DNA der identifizierten Klone. Die Oligonukleotide konnten außerhalb der Homologie-regionen anlagern und ermöglichten so einen Nachweis der Deletion auf dem Chromosom. Bei erfolgreicher Deletion hat das erwartete PCR-Produkt eine Größe von ~1,6 kbp, lag der ursprüngliche Zustand vor, trat kein PCR-Produkt auf. In Abb. 3.11A ist die Überprüfung zweier Klone mittels PCR auf genomischer DNA dargestellt. Beide Klone wiesen das erwartete PCR-Produkt auf. Die Deletion wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt. Im Anschluss wurde eine

Southernblot-Analyse durchgeführt, um die Deletion zu verifizieren. Hierfür wurde chromosomale DNA mit dem Restriktionsenzym *NdeI* vollständig hydrolysiert. Als Sonde wurde die Flanke B der Deletionskassette verwendet, die mit den Oligonukleotiden PBSX4 und PBSX5 amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss mit Biotin markiert (siehe 2.13.1) und für die Hybridisierung herangezogen. Das Ergebnis der Southernblot-Analyse für Klon 1 ist in Abb. 3.11B dargestellt.

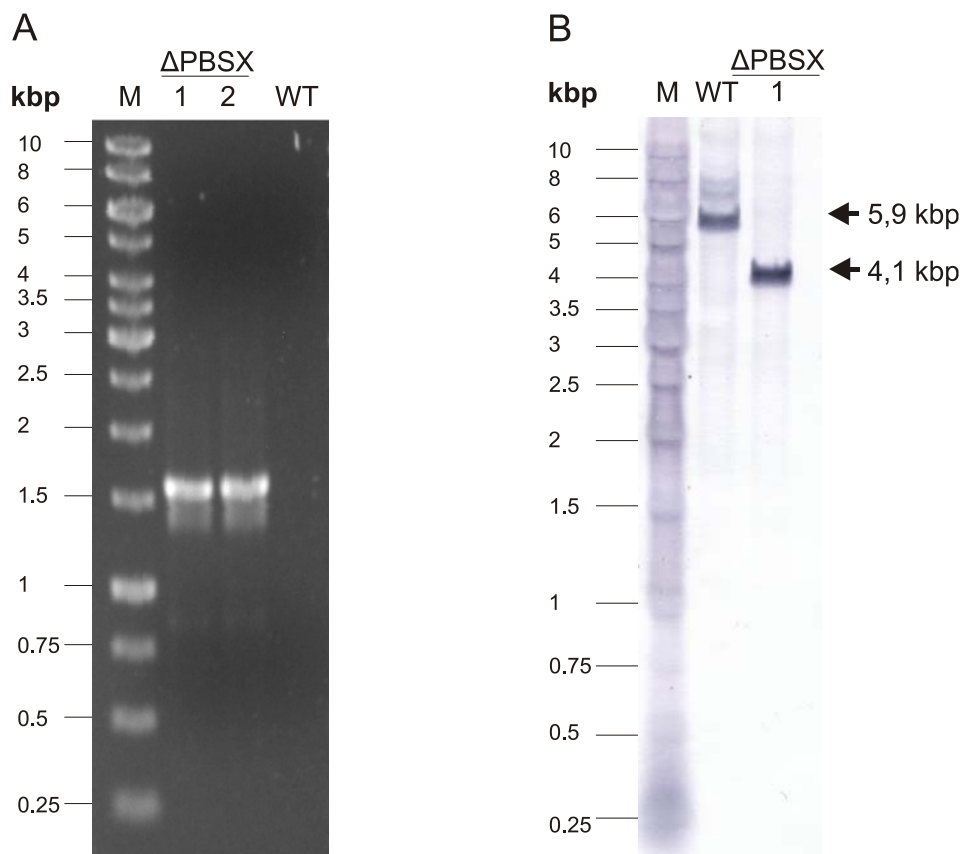


Abb. 3.11: Nachweis der Deletion des PBSX-orthologen Phagen in *B. licheniformis* MW3.1: **A** Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Ansätzen amplifiziert mit den Oligonukleotiden PBSX1 und PBSX6; untersucht wurden zwei Klone der PBSX-orthologen Mutante, als Referenz wurde *B. licheniformis* MW3 verwendet (WT); **B** Southernblot-Analyse zum Nachweis der Deletion des PBSX-orthologen Phagen in *B. licheniformis* MW3.1; Genomische DNA von *Bacillus licheniformis* MW3.1 Klon 1 und *B. licheniformis* MW3 (WT) wurden mit *NdeI* vollständig hydrolysiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert; die Hybridisierung erfolgte mit der Biotin-markierten Sonde des PBSX4 und PBSX5 PCR-Produktes.

Durch die Deletion des PBSX-orthologen Phagen gingen sieben *NdeI* Schnittstellen verloren (siehe Abb. 3.10). Dadurch lieferte die Southernblot-Analyse den Nach-

weis eines DNA-Fragmentes in einer Größe von ca. 4,1 kbp. Die Hybridisierung mit Wildtyp-DNA lieferte dagegen ein Fragment von der Größe 5,9 kbp.

Um einen möglichen Phänotyp zu detektieren, wurden erneut Induktionsversuche mit Mitomycin C durchgeführt. Neben *B. licheniformis* MW3 wurde dieses Mal auch *B. licheniformis* MW3.1 auf Phageninduktion untersucht. Hierfür wurden die Versuchsbedingungen gewählt, wie sie bereits in Abb. 3.9 Anwendung fanden. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 3.12 im Vergleich zum Ausgangsstamm dargestellt. Sowohl für *B. licheniformis* MW3 als auch für *B. licheniformis* MW3.1 wurden jeweils der Wachstumsverlauf einer mit und einer ohne Mitomycin C induzierten Kultur bestimmt.

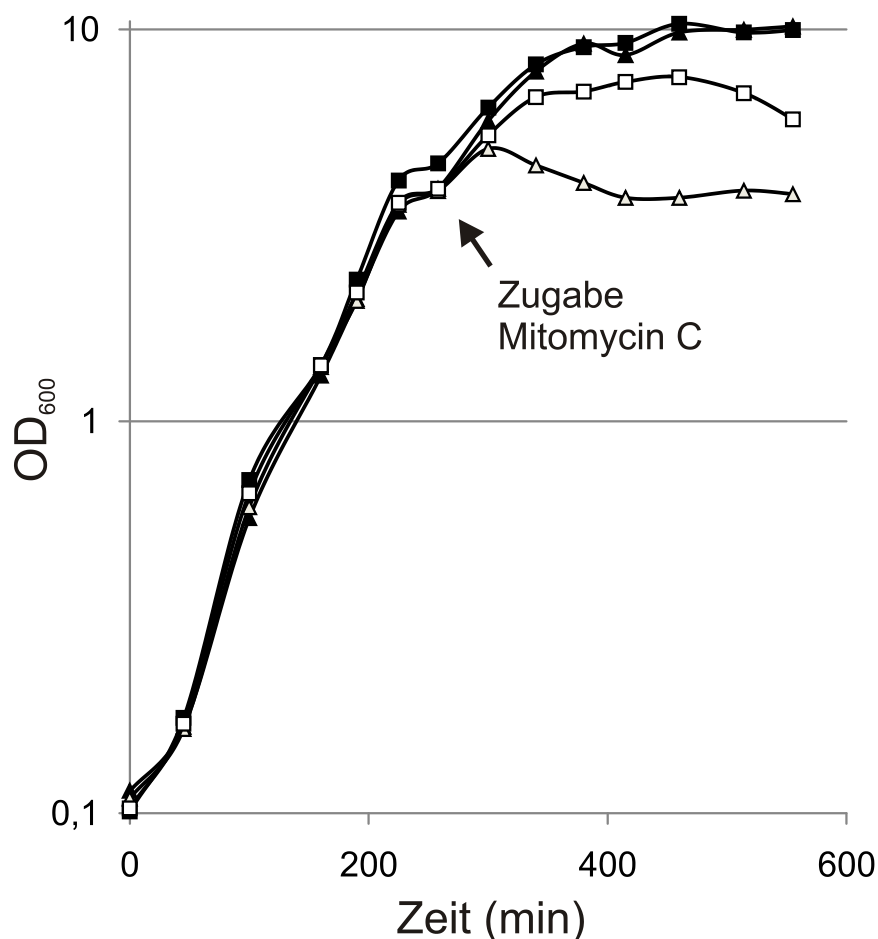


Abb. 3.12: Vergleich der Wachstumskurven von *B. licheniformis* MW3 (▲, △) und *B. licheniformis* MW3.1 (■, □) mit (□, △) und ohne Induktion (■, ▲) durch Mitomycin C in LB_{mod.} bei 37°C und 150 UpM: Pfeil markiert den Zeitpunkt der Induktion mit Mitomycin C.

Die Wachstumsverläufe der beiden nicht mit Mitomycin C induzierten Kulturen des Ausgangs- und des Mutantenstammes verliefen annähernd gleich. Betrachtet man aber die Wachstumskurven der beiden induzierten Kulturen, ist ein deutlicher Unterschied zu beobachten. Während für den Ausgangsstamm nach Induktion eine deutliche Abnahme in der optischen Dichte zu erkennen war, zeigte die Wachstumskurve des Stammes *B. licheniformis* MW3.1 nach Induktion eine flachere Kurve und schwenkte früher als die Wachstumskurven der beiden Referenzkulturen in die stationäre Phase ein. Die Abnahme in der Wachstumsrate war vermutlich auf die Toxizität des Mitomycin C zurückzuführen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Überständen der Mutante *B. licheniformis* MW3.1 konnten keine Phagenpartikel identifiziert werden, die denen in Abb. 3.9 B und C dargestellten Partikeln entsprachen (Daten nicht aufgeführt).

3.2.2. Gendeletion in *B. licheniformis* H1

Bei *B. licheniformis* H1 handelt es sich um einen Produktionsstamm der Firma Henkel. Wie bereits unter 3.1.3 beschrieben, konnte in diesen Stamm durch eine *in vivo*-Methylierungsstrategie DNA übertragen werden. Mit Hilfe des Vektors pMAD sollte im Anschluss das Gen Bh02419 deletiert werden.

Mit den Oligonukleotiden Bh2, Bh3, Bh4 und Bh5 wurden die Flanken A und B amplifiziert, die als Homologieregionen der Erzeugung der Gendeletion dienen (siehe Abb. 3.13). Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass eine Deletion innerhalb des Leserasters erfolgte, wodurch das ursprüngliche Gen lediglich verkürzt wurde. Den Oligonukleotiden Bh2 und Bh5 wurden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Bam*HI und *Eco*RI angefügt, während die Oligonukleotide Bh3 und Bh4 die invers komplementäre Sequenz des jeweils anderen Oligonukleotids als Anhang erhielten. Die Flanken A und B wurden mittels einer SOE-PCR fusioniert (siehe 2.10.2) und in den Vektor pMAD über *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen kloniert. Der Vektor wurde, wie unter 3.1.3 beschrieben, in *B. licheniformis* H1 transformiert. Die Erzeugung der Gendeletion folgte dem unter 2.16 beschriebenen Protokoll, das bei der Deletion des PBSX-orthologen Phagens in *B. licheniformis* MW3 bereits Anwendung fand (siehe 3.2.1).

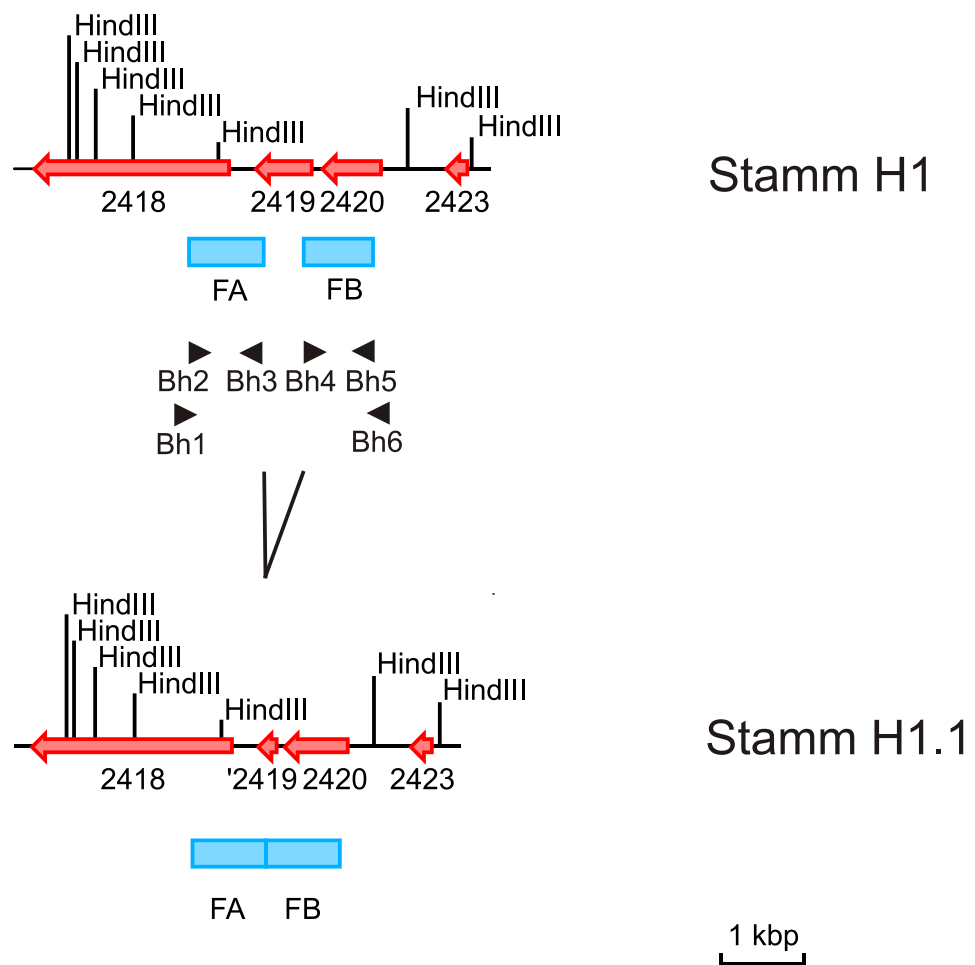


Abb. 3.13: Übersicht über die Erzeugung der Gendeletion Bh02419 in *B. licheniformis* H1: rote Pfeile kennzeichnen Gene in ihrer Leserichtung; schwarze Pfeile Anlagerungsstellen der verwendeten Oligonukleotide; blaue Kästen die Bereiche, die für die Erzeugung der Deletionskassette verwendet wurden; Restriktionsschnittstellen sind mit einem Verweis auf ihre Position angegeben.

Für die Detektion der Gendeletion wurden die Oligonukleotide Bh1 und Bh6 verwendet (siehe Tab. A1). Diese Oligonukleotide sind komplementär zu Bereichen auf dem Chromosom von *B. licheniformis* H1, die sich außerhalb der Flankenregionen befinden. In Abb. 3.14A ist der Nachweis der Deletion für zwei ausgewählte Klone dargestellt. Es ist deutlich der Größenunterschied zwischen den PCR-Produkten auf genomischer DNA des Ausgangsstammes und der *B. licheniformis* H1.1 Mutante zu erkennen. Die Deletion wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt (Daten nicht aufgeführt).

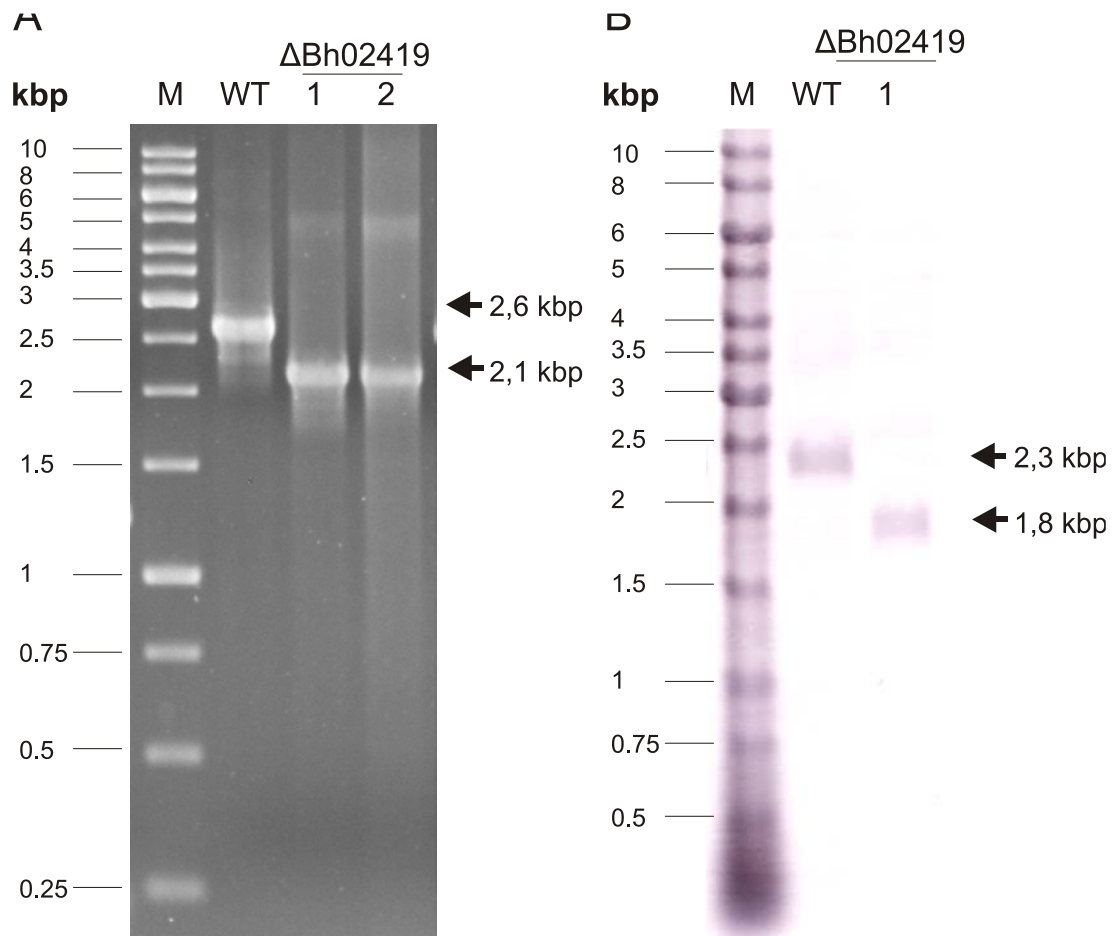


Abb. 3.14: Nachweis der Gendeletion Bh02419 in *B. licheniformis* H1.1: **A** Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Ansätzen amplifiziert mit den Oligonukleotiden Bh1 und Bh6; untersucht wurden zwei Klone der Mutante *B. licheniformis* H1.1, als Referenz wurde *B. licheniformis* H1 verwendet (WT); **B** Southernblot-Analyse zum Nachweis der Gendeletion Δ Bh02419 in *B. licheniformis* H1.1; Genomische DNA von *B. licheniformis* H1.1 Klon 1 und *B. licheniformis* H1 (WT) wurden mit *Hind*III vollständig hydrolysiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert; die Hybridisierung erfolgte mit der Biotinmarkierten Sonde des Bh4 und Bh5 PCR-Produktes.

Die Deletion wurde mittels Southernblot-Analyse verifiziert (siehe Abb. 3.14 B). Hierfür wurde chromosomale DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind*III vollständig hydrolysiert. Das PCR-Produkt der Flanke B der Deletionskassette wurde für die Erstellung der biotinmarkierten Sonde verwendet. Als Referenz wurde *Hind*III-hydrolysierte chromosomale DNA des Ausgangsstammes *B. licheniformis* H1 genutzt. In Abb. 3.14 B ist ein deutlicher Unterschied in den Fragmentgrößen der beiden Stämme zu erkennen. Während der Ausgangsstamm *B. licheniformis* H1 ein DNA-Fragment in der Größe von ca. 2,3 kbp aufwies, war das der Mutante *B. licheniformis* H1.1 um ca. 500 bp reduziert. Die Größe dieser Bande lag bei ca.

1,8 kbp. Somit konnte der "Shuttle-Vektor" pMAD erfolgreich für die Gendeletion in *B. licheniformis* H1 eingesetzt werden.

3.3. Markerfreie Insertion in *B. licheniformis* MW3

Neben Methoden zur Reduktion eines Genoms spielen auch solche zur Einbringung zusätzlicher Eigenschaften eine wichtige Rolle in der Erstellung eines Optimalgenoms. Insertionen gestalten sich aber bedeutend schwieriger als Deletionen, da anstelle eines kleinen Deletionskonstruktes ein deutlich größeres Insertionskonstrukt erzeugt werden muss. Darüber hinaus müssen eingebrachte Gene oder Gencluster auch ihre Eigenschaft entfalten können, was vom Zielorganismus abhängig ist.

Stickstofflimitierung spielt bei vielen Wachstumsprozessen eine wichtige Rolle. *B. licheniformis* 9945A verwertet neben den anorganischen Verbindungen Ammonium und Nitrat auch Harnstoff als Stickstoffquelle (siehe 3.4.8). Vor allem beim Abbau von Arginin bringt dies einen deutlichen Vorteil, da dabei Arginin zu Ornithin und Harnstoff umgesetzt wird (Cruz-Ramos, et al., 1997). Die Umsetzung von Harnstoff erfolgt durch das Enzym Urease. In *B. licheniformis* 9945A kodieren drei Gene für die strukturellen Untereinheiten dieses Enzyms (siehe 3.4.8). Darüber hinaus sind fünf akzessorische Gene mit diesem assoziiert, die in die Reifung des Enzyms involviert sind. Ein möglicher Harnstoff-Transporter schließt sich direkt daran an. Aufgrund der Tatsache, dass sich Transkriptionsstartpunkte und die damit assoziierten Regulationsmotive innerhalb des Genclusters befinden, eignet sich dieser sehr gut als Insertionsobjekt. *B. licheniformis* DSM13, ein enger Verwandter von *B. licheniformis* 9945A, ist nicht fähig Harnstoff zu verwerten. Daher wurde dieser als Zielorganismus für die Insertion des Urease-Clusters ausgewählt. Als Insertionsort wurde der Arginin-Abbaucuster bestehend aus den Genen einer Arginase (ArgI), einer Arginin/Ornithin/Gamma-Aminobutyrat-Permease (RocE), einer Ornithin-Aminotransferase (RocD) und einem Transkriptionsregulator (RocR) ausgewählt. Die Insertion erfolgte stromaufwärts des Arginase-Gens (siehe Abb. 3.16).

Für eine gezielte Insertion benötigt man eine Kasette, die zwischen flankierenden Homologieregionen den Insertionscluster aufweist. Die Klonierung erfolgte durch eine Kombination aus SOE-PCR und Hybridisierung (siehe Abb. 2.2). Als Hybridisierungsüberhänge dienten die Homologieregionen für die Insertion in

B. licheniformis MW3. Diese wurden jeweils an den Vektor und an das Insert fusioniert. Hierfür wurde der Vektor pKVM2 verwendet, der mit den Oligonukleotidpaaren VecH1/VecH2 und VecH3/VecH4 amplifiziert wurde (siehe Tab. A1). Der Urease-Gencluster wurde mit den Oligonukleotidpaaren Ure1/Ure2 und Ure3/Ure4 mit genomischer DNA von *B. licheniformis* 9945A als Matrize amplifiziert. Die Flanken für die Insertion wurden mit den Oligonukleotiden Arg1-8 erzeugt. Für die SOE-PCR wurden jeweils zwei PCR-Amplifikate verwendet, die mit invers komplementären Fusionsoligonukleotide erzeugt wurden. Inverse Komplementarität besitzen die Oligonukleotidkombinationen VecH1/Arg1, VecH4/Arg5, Ure1/Arg4 und Ure4/Arg8. Dementsprechend wurden die PCR-Produkte dieser Fusionsoligonukleotidkombinationen für einen gemeinsamen SOE-PCR-Ansatz verwendet. Für die SOE-PCRs wurden die Oligonukleotidpaare VecH2/Arg2, VecH3/Arg6, Ure2/Arg3 und Ure3/Arg7 verwendet. Die daraus resultierenden PCR-Produkte wurden für die Hybridisierung verwendet. Die Anlagerung vollzog sich wie in Abb. 2.2 dargestellt. Im Anschluss erfolgte die Transformation in *E. coli* TOP10. Für die Suche nach entsprechenden Klonen wurde auf Plasmidpräparation mit anschließendem Restriktionsverdau zurückgegriffen. Die Plasmidkarte des erwarteten Insertionsvektors und das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abb. 3.15 dargestellt.

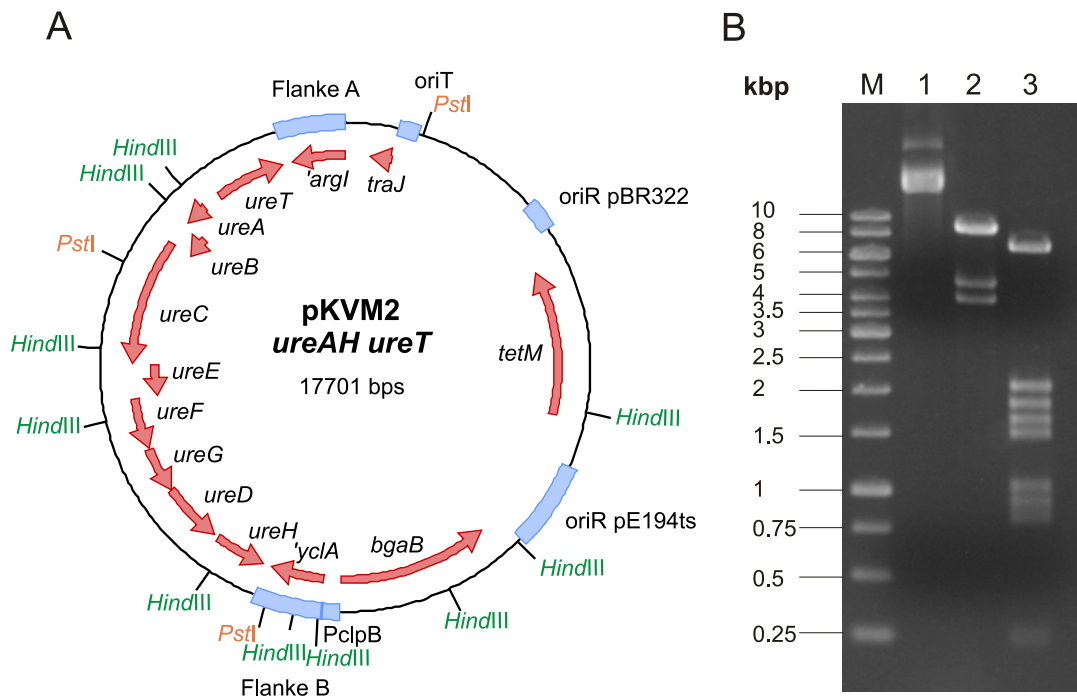


Abb. 3.15: Nachweis des Urease-Insertionsplasmides in *E. coli* TOP10: **A** Plasmid-Karte des Vektors pKVM2 *ureAH ureT* mit den Restriktionsschnittstellen für *PstI* und *HindIII*; **B** Plasmidpräparation des Urease-Insertionsplasmides aus *E. coli* TOP10 (Spur 1), Restriktionsverdau mit dem Enzym *PstI* (Spur 2) und *HindIII* (Spur 3).

Der konstruierte Vektor hat eine Größe von 17,7 kbp. Die Überprüfung des Vektors erfolgte durch Hydrolyse mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *HindIII* (siehe Abb. 3.15 B). Die Hydrolyse des Plasmides mit *PstI* lieferte das erwartete Dreibandemuster, während ein *HindIII*-Verdau die erwarteten elf Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung zeigte. Des Weiteren wurden die Übergänge zwischen Insert, Flanken und Vektor durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung verifiziert (Daten nicht aufgeführt).

Der Insertionsvektor wurde anschließend in *E. coli* S17-1 transformiert und per Konjugation auf *B. licheniformis* MW3 übertragen. Die Konjugation erfolgte wie unter 2.14.3 beschrieben. Transkonjuganten zeigten kein Wachstum in Minimalmedium mit Glukose und Harnstoff als einziger Stickstoffquelle (Daten nicht aufgeführt). Bei der Erzeugung der Insertion machte man sich den temperatursensitiven Replikationsursprung des zugrundeliegenden Plasmides pKVM2 zunutze. Durch Inkubation bei 42 °C unter selektiven Bedingungen und durch Zugabe von Tetracyclin wurde auf die Integration des Insertionsvektors selektiert. Weitere Passagen erfolg-

ten bei 30 °C, die anschließend auf NB/Glukose/X-Gal-Platten ausgebracht wurden, da kein Wachstum auf Minimalmedium mit Glukose und Harnstoff zu beobachten war. Für die Überprüfung der Insertion wurden die Oligonukleotide Ins1-4 in den Kombinationen Ins1/Ins2, Ins3/Ins4 und Ins1/Ins4 verwendet. Die Anlagerungsstellen sind in Abb. 3.16 dargestellt.

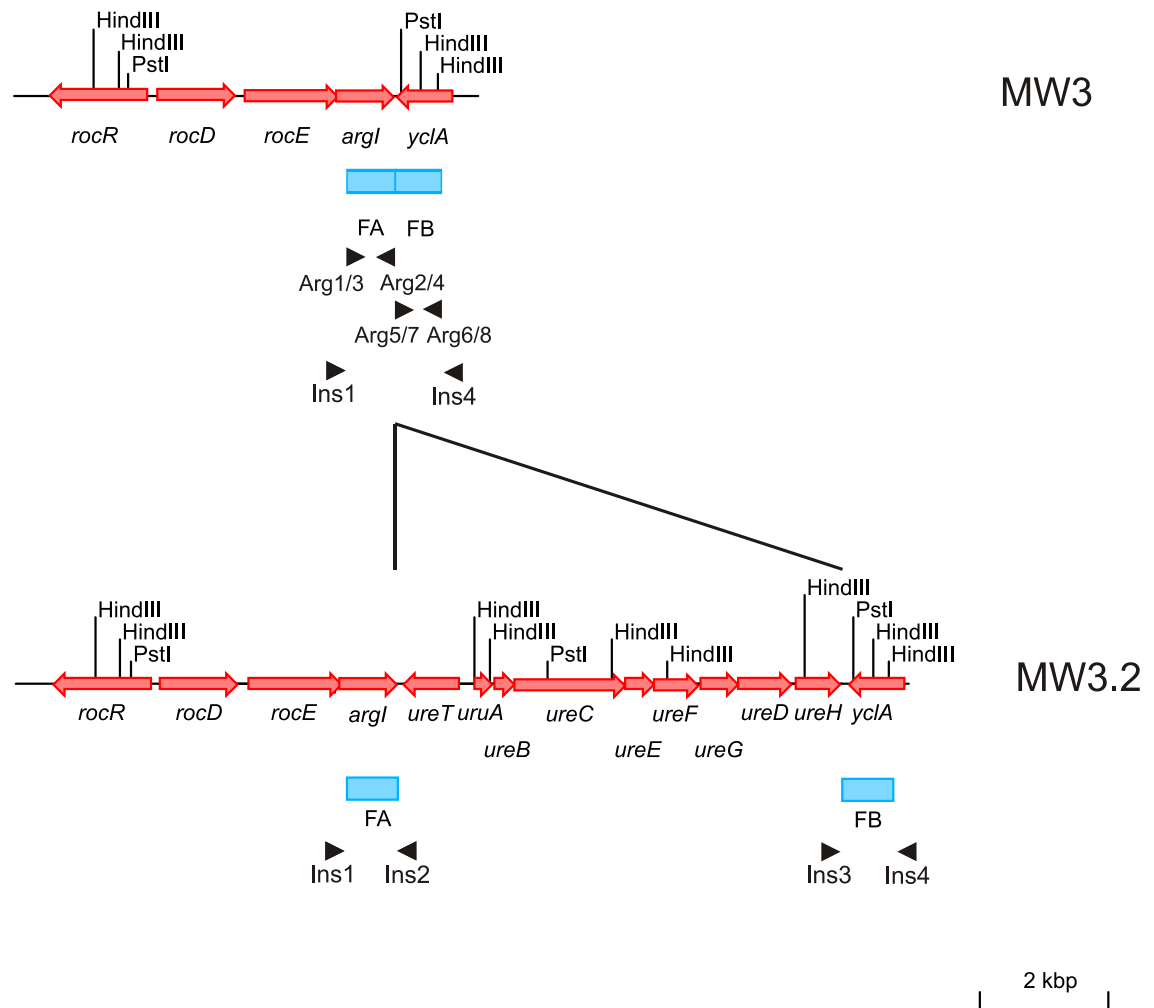


Abb. 3.16: Übersicht über die Erzeugung der Urease-Insertion in *B. licheniformis* MW3: rote Pfeile kennzeichnen Gene in ihrer Leserichtung; schwarze Pfeile Anlagerungsstellen der verwendeten Oligonukleotide; blaue Kästen die Bereiche, die für die Erzeugung der Insertionskassette verwendet wurden; Restriktionsschnittstellen sind mit einem Verweis auf ihre Position angegeben.

Das Ergebnis der Suche mittels PCR ist in Abb. 3.17 A dargestellt. Es wurden 50 Klone getestet. Alle Klone, die per PCR mit den Oligonukleotidkombinationen Ins1/Ins2 und Ins3/Ins4 positiv getestet wurden, wurden per Sequenzierung bestätigt. Bei allen positiv getesteten Klonen konnte aber auch ein PCR-Produkt nach-

gewiesen werden, das dem PCR-Produkt auf chromosomaler DNA des Wiltyps entsprach (siehe Abb. 3.17A). Zwei dieser Klone wurden im Anschluss per Southernblot-Analyse untersucht, um den Grad der Insertion zu untersuchen. Die chromosomale DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Pst*I vollständig hydrolysiert. Als Sonde wurde das PCR-Produkt der Flanke A verwendet und mit Biotin markiert. Bei einer Insertion des Urease-Genclusters liegt ein 6,6 kbp großes DNA-Fragment vor. Sollte der ursprüngliche Zustand weiterhin zutreffen, wurde mit einem 4,3 kbp DNA-Fragment gerechnet.

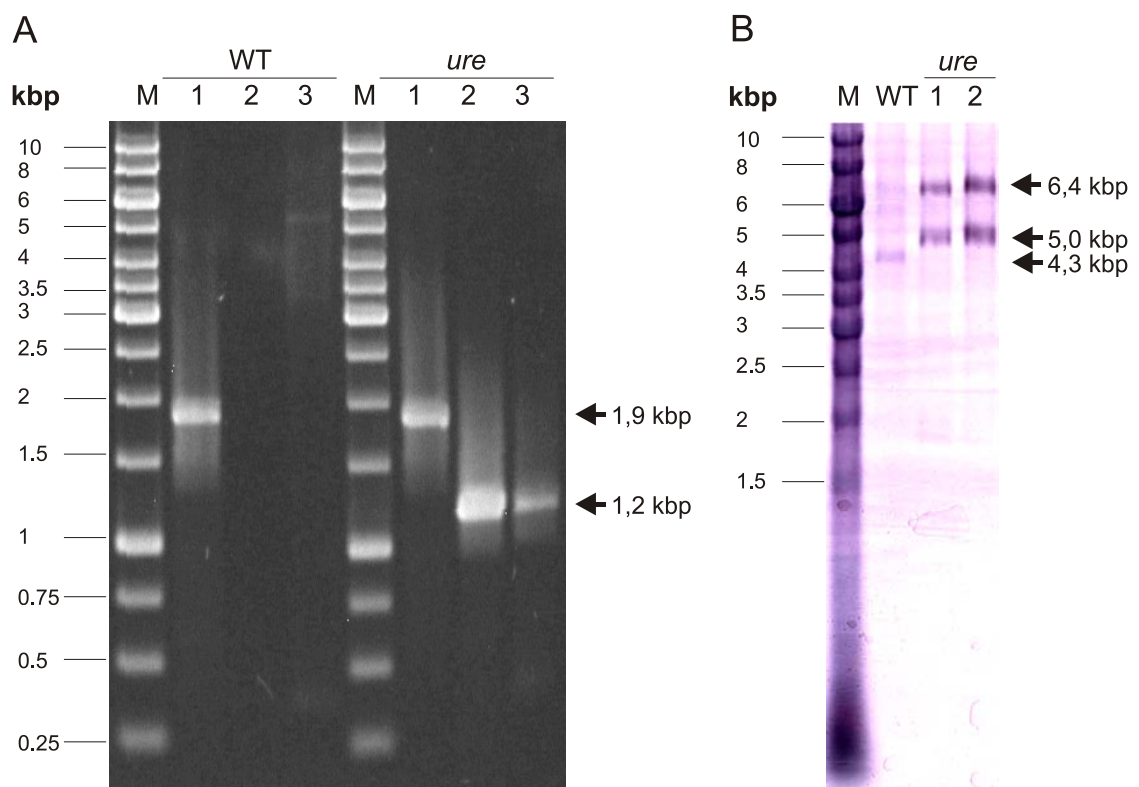


Abb. 3.17: Nachweis der Insertion des Urease-Genclusters in *B. licheniformis* MW3.2: **A** Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Ansätzen amplifiziert mit den Oligonukleotiden Ins1/ Ins4 (1), Ins1/Ins2 (2) und Ins3/Ins4 (3); dargestellt ist exemplarisch ein Klon des Insertionsmutante *B. licheniformis* MW3.2, als Referenz wurde *B. licheniformis* MW3 verwendet (WT); **B** Southernblot-Analyse zum Nachweis der Insertion des Urease-Genclusters *ureAH ureT* in *B. licheniformis* MW3.2; Genomische DNA von *B. licheniformis* MW3.2 und *B. licheniformis* MW3 (WT) wurden mit *Pst*I vollständig hydrolysiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert; die Hybridisierung erfolgte mit der Biotin-markierten Sonde des Arg3 und Arg4 PCR-Produktes.

In Abb. 3.17 B ist zu sehen, dass die Southernblot-Analyse zwei DNA-Fragmente für Klon 1 und 2 offenbarte. Die 6,4 kbp-Bande entsprach dem erwarteten DNA-

Fragment für eine erfolgreiche Insertion. Das zweite Fragment hat eine Größe von ca. 5 kbp und ist deutlich über dem Wildtyp DNA-Fragment lokalisiert. Dies lässt auf eine Instabilität der durchgeführten Insertion schließen.

Um festzustellen, ob die Fähigkeit des Wachstums mit Harnstoff als Stickstoffquelle übertragen wurde, wurden *B. licheniformis* 9945A, *B. licheniformis* MW3 und *B. licheniformis* MW3.2 in einem Mineralmedium mit Harnstoff angezogen (siehe 2.2.2). Als Energiequelle diente Glukose, dass dem Medium kurz vor Gebrauch steril zugefügt wurde. Mit ÜN-Kulturen in NB wurde die erste Passage angeimpft und bei 37 °C und 150 UpM inkubiert. Nach 48 h wurden die Kulturen in die zweite Passage überführt und weitere 48 h inkubiert. Die Kulturen wurden passagiert, um ein Wachstum aufgrund von verschleppten NB-Mediumsbestandteilen auszuschließen. Das Ergebnis der zweiten Passage ist in Abb. 3.18 dargestellt.

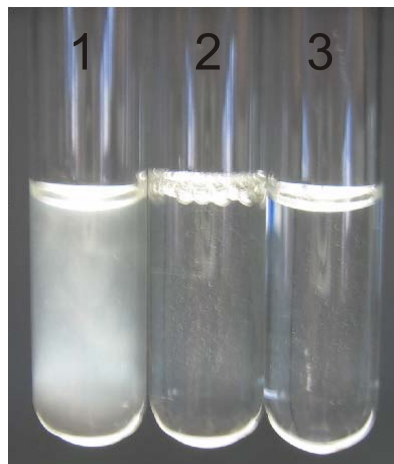


Abb. 3.18: Wachstum auf Mineralmedium mit Harnstoff als Stickstoffquelle: dargestellt sind die Kulturen von *B. licheniformis* 9945A (1), *B. licheniformis* MW3 (2) und *B. licheniformis* MW3.2 (3) in der zweiten Passage; die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 150 UpM.

Lediglich für *B. licheniformis* 9945 A konnte eine Trübung des Mediums beobachtet werden, was auf ein Wachstum schließen lässt. Sowohl *B. licheniformis* MW3 als auch *B. licheniformis* MW3.2 zeigten kein Wachstum auf Harnstoff als Stickstoff- und Glukose als Kohlenstoffquelle.

3.4. Das Genom von *B. licheniformis* 9945A

Bisher ist mit *B. licheniformis* DSM13 erst die Genomsequenz eines Vertreters dieser Spezies öffentlich zugänglich (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004). Durch diese Arbeit steht die Genomsequenz eines weiteren Vertreters dieser Spezies zur Verfügung.

3.4.1. Sequenzierung, Lückenschluss und Annotation

Der Großteil der Sequenzierarbeit sollte mit Hilfe der 454-Technologie erfolgen. Diese Methode ermöglicht die Generierung deutlich größerer Datenmengen in kürzerer Zeit im Vergleich zur Sequenzierung nach Sanger (Margulies, et al., 2005).

B. licheniformis 9945A wurde hierfür in Minimalmedium mit Glukose bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen (siehe 2.2.2 und 2.3.). Die Zellen wurden abgeerntet und die genomische DNA mit Hilfe des „Master Pure DNA Purification Kits“ (Fa. Epicentre, Madison, U.S.A) daraus isoliert (siehe 2.9.4.). Die 454-Sequenzierung erfolgte im Anschluss durch Dr. Andrea Thürmer. Dies lieferte 313.600 Einzelsequenzen, die eine durchschnittliche Länge von 230 bp hatten. Mit Hilfe des „Newbler Assembler“ (Fa. Roche, Mannheim) fand eine Assemblierung statt. Dies lieferte 70 Contigs im Größenbereich über 500 bp. Die errechnete Größe des Genomes betrug zu diesem Zeitpunkt 4.321.553 bp.

Eine Orientierung der Contigs erfolgte mit Hilfe von Fosmiden und *B. licheniformis* DSM13 als Referenzgenom. Es wurden insgesamt 196 Fosmide endständig sequenziert und für die Orientierung verwendet (siehe 2.12.4). Anhand der Genomsequenz von *B. licheniformis* DSM13 fand eine weitere Kartierung der Contigs statt. Die Lücken wurden sofern möglich PCR-basiert geschlossen (siehe 2.19). Für repetitive Bereiche wurde auf eine kombinierte Strategie aus Subklonierung und Transposonmutagenese zurückgegriffen (siehe 2.15 und 2.19). Dies betraf vor allem den Bereiche der Gene Bali_c09030 und Bali_c09050. Insgesamt wurden 96 Transposoninsertionen der Subklonierung Bali_c09030 und 48 Transposoninsertionen der Subklonierung Bali_c09040 sequenziert.

Nach der Lückenschlussesphase erfolgte eine ORF-Vorhersage durch das Programm YACOP (Tech and Merkl, 2003). Eine automatische Annotation erfolgte durch das Programm BiBaG (Antje Wollherr, persönliche Kommunikation). Auf Basis dieses Programms wurden die Proteinsequenzen aller aus der ORF-

Vorhersage resultierender ORFs mit den Sequenzen aller Proteine des 2009 neu annotierten *B. subtilis* 168 Genoms verglichen (Barbe, et al., 2009). Wurden orthologe Gene in *B. licheniformis* 9945A gefunden, fand eine Übertragung der Genbezeichnungen statt. Eine anschließende manuelle Überprüfung der Gene wurde mit Hilfe des Programms ERGO durchgeführt (Overbeek, et al., 2003). Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit befand sich dieses Projekt in der Übermittlungsphase. Die Genomsequenz war daher noch nicht frei zugänglich. Das Projekt erhielt bei NCBI die Identifikationsnummer 49115.

3.4.2. Allgemeine Eigenschaften des Genoms

Das Genom von *B. licheniformis* 9945A besteht aus einem Chromosom, das eine Größe von 4.374.064 bp hat. Plasmide konnten in diesem Zusammenhang nicht nachgewiesen werden. Tab. 3.2 gibt eine Übersicht über die allgemeinen Eigenschaften des Chromosoms von *B. licheniformis* 9945A im Vergleich zu *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyliquefaciens* FZB42 wieder (Barbe, et al., 2009, Chen, et al., 2007, Chen, et al., 2009, Kunst, et al., 1997, Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004).

Tab. 3.2: Übersicht über die allgemeinen Eigenschaften der Chromosomen aus *B. licheniformis* 9945A, *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42.

Eigenschaften	<i>B. licheniformis</i> 9945A	<i>B. licheniformis</i> DSM13	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. amylolique-</i> <i>faciens</i> FZB42
Länge [bp]	4,376,307	4.222.645	4.214.630	3.918.589
GC-Gehalt [Mol%]	45,92	46,16	43,52	46,48
Anteil der kodier- enden Sequenz [%]	88,4	87,9	88,6	88,0
Gene	4.361	4.286	4.292	3.810
ribosomale RNA- Operons	7	7	10	10
Anzahl der tRNAs	72	72	86	89

B. licheniformis besitzt das größte Chromosom der vier aufgelisteten *Bacillus*-Spezies. Dementsprechend ist die Anzahl der Protein- und RNA-kodierenden Gene mit 4.361 deutlich höher als in den Vergleichsorganismen (siehe Tab. 3.2). Dies liegt vor allem an der höheren Anzahl an proteinkodierenden Genen, da die Anzahl der tRNAs im Vergleich zu 86 in *B. subtilis* 168 und 89 tRNAs in *B. amyloliquefaciens* sogar niedriger ausfällt. Die Ausstattung des Genoms mit sieben ribosomalen RNA Operons und 72 tRNAs entspricht der in *B. licheniformis* DSM13 (siehe Tab. 3.3). Der GC-Gehalt und der Anteil der kodierenden Sequenz unterscheiden sich kaum von anderen Bacillen.

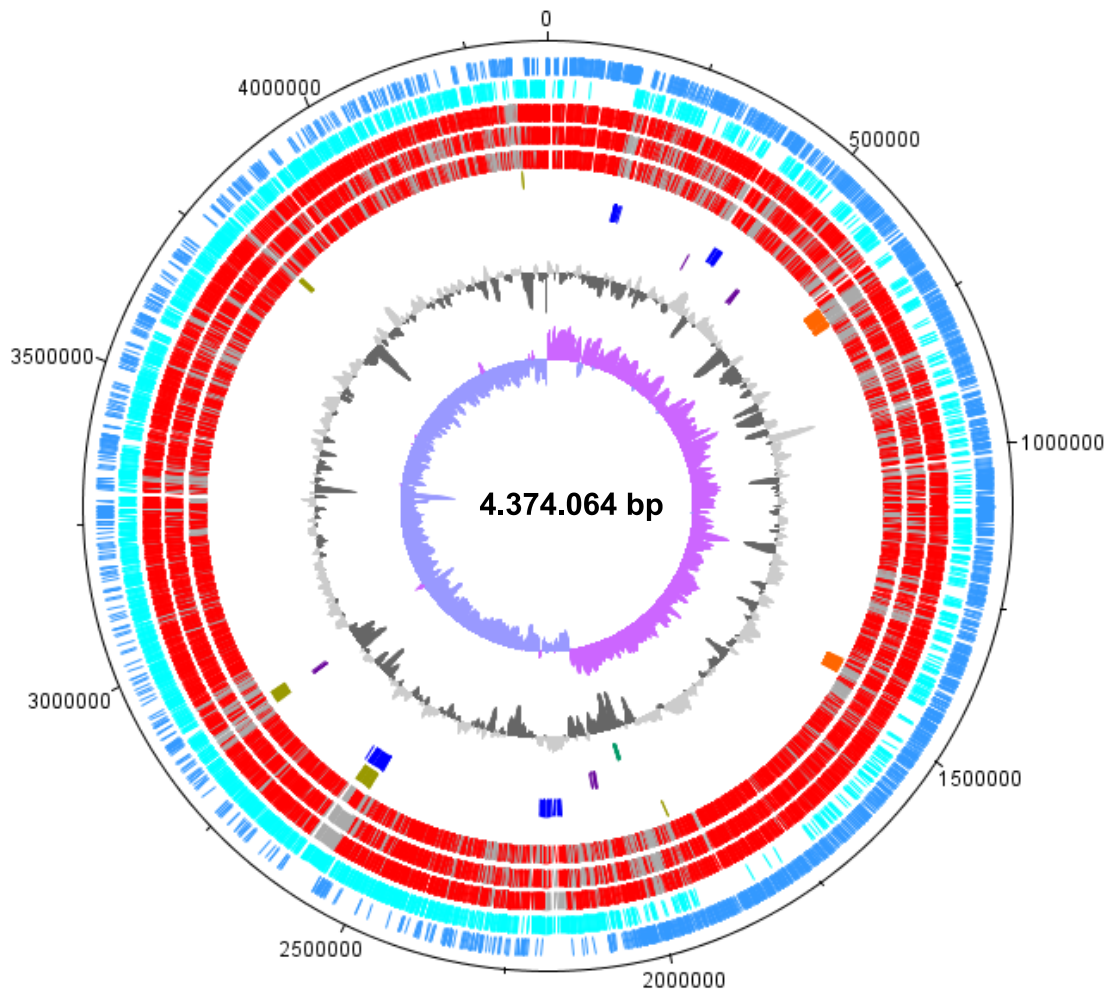


Abb. 3.19: Schematische Darstellung des Chromosoms aus *B. licheniformis* 9945A: Die beiden äußeren Ringe geben die Orientierung der CDS auf dem Leit- (blau) bzw. Gegenstrang (türkis) wieder; die Ringe 3-5 stellen das Ergebnis einer BiBaG-Analyse des Genoms von *B. licheniformis* 9945A mit dem von *B. licheniformis* DSM13 (Ring 3), *B. subtilis* 168 (Ring 4) und *B. amyliquefaciens* FZB42 (Ring 5) dar, rote Bereiche beschreiben Orthologe, graue Bereiche Gene zu denen keine Orthologe gefunden wurden; Ring 6 gibt die Positionen der identifizierten Fremdgene (hell-grün) und Prophagen (orange) wieder; Ring 7 (dunkel-blau) gibt die Positionen der Lantibiotischen und NRPS-Gencluster, Ring 8 (violett) die Position der Gene der Nitratreduktion, Ring 9 (grün) die Position des Urease-Genclusters auf dem Chromosom von *B. licheniformis* 9945A wieder; Ring 10 zeigt die Abweichungen vom durchschnittlichen GC-Gehalt auf; Ring 11 stellt den "GC-Skew" dar.

3.4.3. Vergleich *B. licheniformis* 9945A mit Vertretern der Gattung *Bacillus*

Mit Hilfe von BiBaG-Analysen wurde *B. licheniformis* 9945A mit anderen Vertretern der Gattung *Bacillus* verglichen. Eine grafische Darstellung des Genomvergleichs ist in Abb. 3.19 dargestellt. Im Vergleich zu *B. licheniformis* DSM13 offenbarte *B. licheniformis* 9945A 485 Gene, die entweder keine oder eine Identität bis maximal 25 % auf Aminosäureebene besitzen (siehe Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Vergleich des Genoms von *B. licheniformis* 9945A mit *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 durch eine BiBaG-Analyse: dargestellt ist die Anzahl der Gene, die eine Übereinstimmung zwischen 0 -25 %, 25 - 75 % und 75 - 100 % zu Genen aus den drei Referenzorganismen auf Basis der AS-Sequenz aufweisen; die ermittelten Werte basieren auf einem globalen Alignment nach Needle-Mann-Wunsch.

Identität	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	DSM13	168	FZB42
0-25%	485	1170	1390
25-75%	104	691	722
75-100%	3679	2407	2156

86 % der proteinkodierenden Gene (75-100 %) in *B. licheniformis* 9945A besitzen Orthologe in *B. licheniformis* DSM13 (siehe Tab. 3.3). Gene mit einer Übereinstimmung zwischen 25 % und 75 % sind mit 104 Genen nur in einem sehr geringen Maße vorhanden. Die Zahl der Gene, die keine Übereinstimmungen mit Genen in *B. licheniformis* DSM13 besitzen, fällt mit 485 dagegen deutlich höher aus. Die Anzahl der Gene mit einer hohen Übereinstimmung (75 % - 100 %) zu Genen in *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 fällt mit 2407 und 2156 deutlich niedriger aus als in *B. licheniformis* DSM13. Es ist zu beobachten, dass die Anzahl der Gene mit hoher Übereinstimmung von *B. licheniformis* DSM13 (3679 Gene) über *B. subtilis* 168 (2407 Gene) nach *B. amyloliquefaciens* FZB42 (2156 Gene) abnimmt. Diese Beobachtung gibt im Grunde auch die Verwandtschaftsbeziehungen von *B. licheniformis* 9945A mit den aufgeführten Vertretern der Gattung *Bacillus* wieder.

3.4.4. Identifizierung von Fremdgenen und Prophagen

Für die Identifizierung von Fremdgenen wurde das Programm "Island Viewer" verwendet (siehe 2.21.3). Mit Hilfe dieses Programmes konnten insgesamt 49 Fremdgene verteilt auf fünf Genombereiche identifiziert werden.

Tab. 3.4: Auflistung der durch "Island Viewer" als fremd identifizierten Genombereiche: neben der Methode, mit der die Identifizierung stattfand, sind Start- und Endpunkte, die Größe und die Anzahl der enthaltenen Gene für diese Bereiche angegeben.

Methode	Start	Ende	Größe (bp)	Anzahl der Gene
IslandPath-DIMOB	1928792	1934397	5605	7
IslandPick	2573063	2611275	38212	10
IslandPath-DIMOB	2842180	2862133	19953	18
SIGI-HMM/ IslandPath-DIMOB	3795524	3806494	10970	11
SIGI-HMM	4322338	4326634	4296	3

Innerhalb dieser Bereiche befinden sich Gene, die für Bacitracin-Synthetasen, eine Nitrat-Reduktase und für Transposasen/Integrasen kodieren. Eine vollständige Auflistung der durch diese Analyse identifizierten Fremdgene ist im Anhang dargestellt (siehe Tab. A2). Bei den Genen für eine dissimilatorische Nitrat-Reduktase handelt es sich um Nitrat-Reduktase 2 (siehe 3.4.10). Ein weiterer Hinweis für potentielle Fremdgene stellte ein abweichender GC-Gehalt dar. Für vier der fünf genomischen Inseln konnte ein GC-Gehalt detektiert werden, der deutlich unter dem durchschnittlichen GC-Gehalt von *B. licheniformis* 9945A lag (siehe Abb. 3.19).

Im weiteren Verlauf der Untersuchung des Genomes von *B. licheniformis* 9945A konnten zwei Phagenregionen identifiziert werden. Region 1 umfasst die Gene BaLi_c06690 bis BaLi_c07200. Dieser Bereich besitzt in Teilen Ähnlichkeit zu einer Phagenregion aus *B. licheniformis* DSM13 (siehe Abb. 3.19) (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004), aber keine Homologien zu Bereichen im Genom von *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42. Bei dem zweiten Phagenbereich handelt es sich um den PBSX-orthologen Phagen (BaLi_c14580 bis BaLi_c14940), der sowohl in *B. subtilis* 168 und *B. licheniformis* DSM13 auftritt. Zu Bereichen in *B. amyloliquefaciens* FZB42 fand sich keine Homologie des PBSX-orthologen Prophagen (siehe Abb. 3.19). Induktionsversuche mit Mitomycin C zeigten auch für *B. licheniformis* 9945A eine Abnahme in der optischen Dichte (Daten nicht aufge-

führt), wie sie für *B. licheniformis* DSM13 beobachtet werden konnten (siehe 3.2.1). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte Phagenpartikel entdeckt werden, die die PBSX-Morphologie aufwiesen (Daten nicht aufgeführt). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dieser Bereich in *B. licheniformis* MW3 deletiert (siehe 3.2.1). Weitere potentielle Prophagen, wie sie in *B. licheniformis* DSM13 auftreten, konnten in *B. licheniformis* 9945A nicht identifiziert werden.

3.4.5. Regulation der natürlichen Kompetenz

B. licheniformis 9945A wurde schon sehr früh als natürlich kompetent beschrieben (Gwinn and Thorne, 1964).

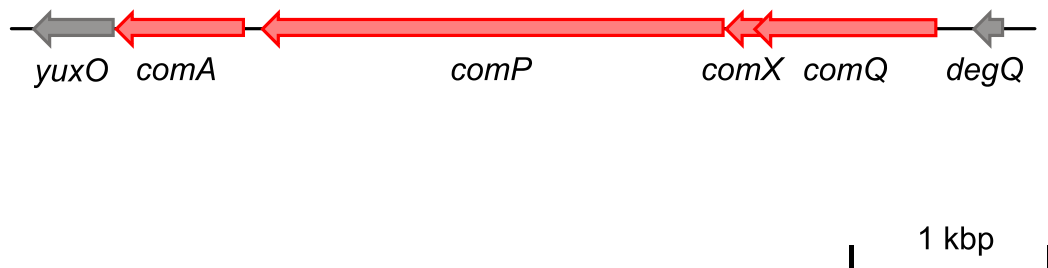


Abb. 3.20: Genetische Organisation des *comQXPA*-Clusters aus *B. licheniformis* 9945A: Gene sind als Pfeile gekennzeichnet, die die Leserichtung wiedergeben; rote Pfeile kennzeichnen Gene von Interesse, graue Pfeile flankierende Gene.

B. licheniformis 9945A besitzt ein intaktes *comP* (BaLi_c34260), was als Cluster mit den Genen *comQ* (BaLi_c34280), *comX* (BaLi_c34270) und *comA* (BaLi_c34250) organisiert ist (siehe Abb. 3.20). Darüber hinaus konnten die Gene *comS* (BaLi_c04160) und *comK* (BaLi_c12410) identifiziert werden. *comS* befindet sich als Gen innerhalb der Lichenysin Synthetase B (siehe 3.4.11). Alle weiteren Gene zur Ausbildung der natürlichen Kompetenz in *B. licheniformis* 9945A konnten identifiziert werden. Eine komparative Analyse der Gene der natürlichen Kompetenz wurde von Antje Wollherr erstellt. Sie verglich dabei die Kompetenzsysteme verschiedener Vertreter der Gattung *Bacillus* untereinander. *B. licheniformis* 9945A, als natürlich kompetent beschriebener Vertreter der Spezies *B. licheniformis*, wurde ebenfalls in diese Analyse mit aufgenommen (Antje Wollherr, persönliche Kommunikation).

Neben seiner für *B. licheniformis* Stämmen hohen natürlichen Kompetenzrate ist *B. licheniformis* 9945A bekannt dafür, große Mengen an Polyglutaminsäure zu produzieren (Yoon, et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass *B. licheniformis* 9945A maximal 35 g/l Polyglutaminsäure mit einer Produktivität von 1 g/l/h produzieren kann. In *Bacilli* ist die Regulation der natürlichen Kompetenz eng mit der Regulation für die Produktion von Polyglutaminsäure verknüpft. Phosphoryliertes ComA aktiviert neben der Transkription von *comS* auch die Transkription von *degQ*. DegQ wiederum erhöht den Phosphotransfer von DegS auf DegU. DegU in seiner phosphorylierten Form initiiert letztlich die Synthese der Polyglutaminsäure (Ohsawa, et al., 2009). Auch SwrA wird für die Polyglutaminsäuresynthese benötigt (Osera, et al., 2009). Im Genom von *B. licheniformis* 9945A konnten die regulatorischen Gene *degS* (BaLi_c37930), *degU* (BaLi_c37920), *degQ* (BaLi_c34290) und *swrA* (BaLi_c37630) identifiziert werden. Die Gene *pgsA* (BaLi_c38490), *pgsB* (BaLi_c38510), *pgsC* (BaLi_c38500) und *pgsE* (BaLi_c38480) konnten ebenso identifiziert werden, die in einem Cluster organisiert sind. Sie kodieren letztlich für die Enzyme der Polyglutaminsäure-Biosynthese.

3.4.6. Restriktion und Modifikation

Restriktions- und Modifikationssysteme spielen eine wichtige Rolle beim DNA-Transfer. *B. licheniformis* DSM13 besitzt zwei TypI-RM-Systeme, die nicht-methylierte DNA nach dem Eindringen in die Zelle hydrolysieren. In *B. licheniformis* MW3, eine *B. licheniformis* DSM13 Doppelmutante, wurden die Restriktionsuntereinheiten dieser RM-Systeme deletiert, was eine deutliche Erhöhung der Transformationseffizienz zur Folge hatte (Waschkau, et al., 2008). Daher ist es wichtig solche Systeme vor dem Beginn genetischer Arbeiten zu entfernen.

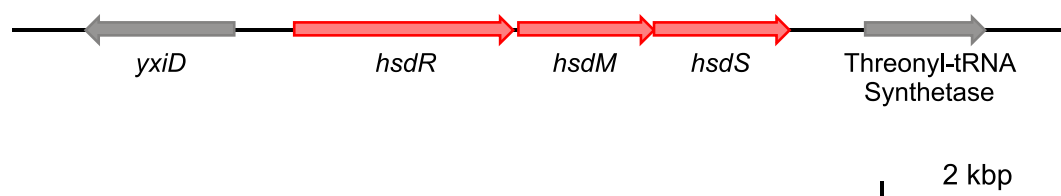


Abb. 3.21: Genetische Organisation des RM-Systems aus *B. licheniformis* 9945A: Gene sind als Pfeile gekennzeichnet, die die Leserichtung wiedergeben.

In *B. licheniformis* 9945A konnte ein TypI-RM-System identifiziert werden. Dieser Gencluster setzt sich aus den drei Genen *hsdR* (BaLi_c10310), *hsdM* (BaLi_c10320) und *hsdS* (BaLi_c10330) zusammen. Dazu gehören die Restriktionsuntereinheit *hsdR*, die Methylierungsuntereinheit *hsdM* und die Untereinheit *hsdS*, die für die Spezifität des RM-Systems von Bedeutung ist (Murray, 2000). Die Gene der Untereinheiten werden in gleicher Richtung abgelesen. Dieses System besitzt teilweise hohe Ähnlichkeiten zu einem TypI-RM-System aus *Enterococcus faecium* E980. Die Identität auf Basis der AS-Sequenz zu den Untereinheiten HsdR und HsdM liegen bei 88 % und 91 %, während sich HsdS deutlich von der Spezifitätsuntereinheit aus *Enterococcus faecium* E980 unterscheidet. Die Identität liegt in diesem Fall lediglich bei 48 %. Dieser Gencluster wird begrenzt durch Gene, die für ein potientielles DNA-binde Protein und eine Threonyl-tRNA-Synthetase kodieren.

3.4.7. Aerobes und anaerobes Wachstum

B. licheniformis wird ebenso wie *B. subtilis* als fakultative anaerobes Bakterium beschrieben (Clements, et al., 2002). *B. licheniformis* 9945A wächst auf Minimalmedium mit Glukose ohne Zusatz von Vitaminen oder Aminosäuren. Im Genom konnten die Gene für die Glykolyse, den Pentosephosphat-Weg und den Tricarbonsäure-Zyklus identifiziert werden. Darüber hinaus besitzt *B. licheniformis* 9945A alle Gene für ein Wachstum auf Minimalmedium mit Glukose. Als Stickstoffquelle kann *B. licheniformis* 9945A neben Ammonium und Nitrat auch Harnstoff nutzen (siehe 3.4.8). Weiterhin weist *B. licheniformis* 9945 Gene auf, die für eine Isocitrate Lyase (BaLi_c41990) und eine Malat-Synthase (BaLi_c42000) kodieren. Die Produkte dieser Gene bilden den Glyoxylat-Bypass, der für ein Wachstum auf C2-Körpern notwendig ist.

Unter anaeroben Bedingungen ist *B. licheniformis* zur Nitrat-Respiration und einer gemischten Säuregärung befähigt, die in zahlreichen Endprodukten resultiert (Acetat, Laktat, Glycerol, Formiat, Acetaldehyd, Succinat, Ethanol, Kohlendioxid) (Bulthuis, et al., 1991). *B. licheniformis* 9945A steht ebenso wie *B. licheniformis* DSM13 eine anaerobe Ribonukleotid-Reduktase (BaLi_c38360) assoziiert mit einem potentiellen Aktivierungsenzym (BaLi_c38350) zur Verfügung (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004). Im Genom konnten zwei dissimilatorische Nitrat-Reduktasen identifiziert werden, die in der Nutzung von Nitrat als alternativen terminalen Elektronenakzeptor in der Atmungskette involviert sein können

he 3.4.10). Auch die Fähigkeit zur Fumarat-Respiration wurde für *B. licheniformis* Stämme beschrieben (Clements, et al., 2002). In diesem Zusammenhang konnten in *B. licheniformis* 9945A aber keine Gene identifiziert werden.

3.4.8. Harnstoffverwertung

Eine alternative Stickstoffquelle stellt Harnstoff dar. Harnstoff kann vom Enzym Urease in Ammonium und CO₂ umgesetzt werden. Bei der Verwertung von Arginin spielt Harnstoff eine wichtige Rolle, da bei der Umsetzung von Arginin durch das Enzym Arginase Ornithin und Harnstoff freigesetzt werden (Cruz-Ramos, et al., 1997). In *B. licheniformis* DSM13 wird Harnstoff bei der Verwertung von Arginin an das Medium abgegeben und nicht weiter verwertet (Schwarzer, 2010).

B. licheniformis 9945A besitzt die Fähigkeit auf Harnstoff als Stickstoffquelle zu wachsen (siehe Abb. 3.1). Infolge der Annotation konnte im Genom von *B. licheniformis* 9945A ein Urease-Gencluster identifiziert werden (siehe Tab. 3.5 und Abb. 3.22).

Tab. 3.5: Auflistung der Gene der Harnstoffverwertung in *B. licheniformis* 9945A

Gennummer	Gen	Annotation
BaLi_c20330	<i>ureT</i>	möglicher Harnstoff-Transporter
BaLi_c20340	<i>ureA</i>	Urease (gamma Untereinheit)
BaLi_c20350	<i>ureB</i>	Urease (beta Untereinheit)
BaLi_c20360	<i>ureC</i>	Urease (alpha Untereinheit)
BaLi_c20370	<i>ureE</i>	Urease akzessorisches Protein
BaLi_c20380	<i>ureF</i>	Urease akzessorisches Protein
BaLi_c20390	<i>ureG</i>	Urease akzessorisches Protein
BaLi_c20400	<i>ureD</i>	Urease akzessorisches Protein
BaLi_c20410	<i>ureH</i>	Urease akzessorisches Protein

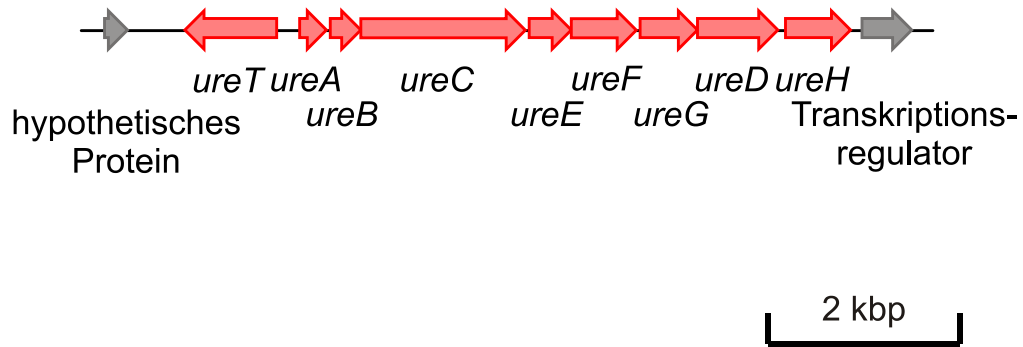


Abb. 3.22: Genetische Organisation des Urease-Genclusters aus *B. licheniformis* 9945A: Gene sind als Pfeile gekennzeichnet, die die Leserichtung wiedergeben.

Der Urease-Gencluster setzt sich aus drei Genen, die für die strukturellen Untereinheiten der Urease kodieren, und fünf Genen, deren Genprodukte bei der Reifung des Enzyms eine Rolle spielen, zusammen. Damit assoziiert tritt ebenfalls ein potentieller Harnstofftransporter auf. Die Gene der strukturellen Untereinheiten besitzen Identitäten zwischen 63 % und 81 % auf Basis ihrer AS-Sequenz zu einer Urease aus *Geobacillus kaustophilus* GN. Flankiert wird dieser Cluster von einem hypothetischen Protein und einem Transkriptionsregulator. In *B. subtilis* 168 konnte ebenfalls eine Urease auf Genom- und Proteomebene nachgewiesen werden (Kim, et al., 2005). Jedoch weist dieser Gencluster im Vergleich zu dem aus *B. licheniformis* 9945A keine Gene für die Reifung des Enzyms auf. Auch ein damit assoziierter möglicher Harnstofftransporter ist in *B. subtilis* 168 nicht vorhanden. *B. subtilis* 168 besitzt lediglich die strukturellen Gene der Urease.

3.4.9. Xylan-Abbau

Xylan, eines der am häufigsten vorkommenden Polysaccharide, stellt eine Hauptkomponente der pflanzlichen Zellwand dar (Subramaniyan and Prema, 2002). Für den Abbau dieses verzweigten Polysaccharides werden verschiedene Enzyme benötigt. Die wichtigste Rolle dabei spielen Endoxylanase und α -Xylosidasen. Da sich das Grundgerüst des Xylan aus Xylose zusammensetzt, erfolgt die Verwertung über die Umwandlung von Xylose zu Xylolose und Xylolose-5-Phosphat. Xylolose-5-Phosphat stellt eine Komponente des Pentosephosphatweges dar (Gu, et al., 2010).

Es wurden sechs Gene in *B. licheniformis* 9945A identifiziert, die in Zusammenhang mit der Depolymerisierung von Xylan stehen (siehe Tab. 3.6). Alle Gene (*xynABCD*, *xynP*), mit Ausnahme von BaLi_c09680, zeigen hohe Homologie zu Orthologen in *B. subtilis* (Bourgois, et al., 2007, Kunst, et al., 1997, Roncero, 1983, St John, et al., 2006). Die Identitäten lagen dabei zwischen 76 % und 92 % auf Basis der AS-Sequenz. BaLi_c09680 besitzt nur schwache Übereinstimmung mit XynB aus *B. subtilis* 168 (34 %), aber eine hohe mit einer möglichen beta-1,4-Xylosidase aus *B. licheniformis* DSM13 (90 %).

Tab. 3.6: Auflistung der Gene des Xylan-Abbaus in *B. licheniformis* 9945A

Gennummer	Gen	Annotation
BaLi_c05970	<i>xynA</i>	Endo-1,4-beta-Xylanase
BaLi_c09680		mögliche Xylan beta-1,4-Xylosidase
BaLi_c29190	<i>xynB</i>	Xylan beta-1,4-Xylosidase
BaLi_c29200	<i>xynP</i>	möglicher H ⁺ -Xylosid-Symporter
BaLi_c36430	<i>xynC</i>	Endo-Xylanase
BaLi_c36440	<i>xynD</i>	alpha-L-Arabinofuranosidase

Lediglich die Gene *xynB/xynP* und *xynC/xynD* liegen kolokalisiert vor. Ein Vergleich auf Basis der Genomorganisation zwischen *B. licheniformis* 9945A und *B. subtilis* 168 offenbarte einen nicht-konservierten Charakter für die Gene des Xylan-Abbaus (siehe Abb. A1).

3.4.10. Nitrat-Reduktion

Nitrat-Reduktasen spielen eine wichtige Rolle sowohl für assimilatorische als auch für dissimilatorische Zwecke (González, et al., 2006). Bei der Assimilation von Nitrat für den Stickstoffhaushalt der Zelle erfolgt eine Umsetzung des Nitrat zu Nitrit und schließlich zu Ammonium. Dabei spielen eine assimilatorische Nitrat- und eine Nitrit-Reduktase eine Rolle. Im Genom von *B. licheniformis* 9945A konnten sowohl assimilatorische als auch dissimilatorische Nitrat-Reduktasen identifiziert werden (siehe Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Auflistung der an der Nitrat-Reduktion beteiligten Gene in *B. licheniformis* 9945A

Gennummer	Gen	Annotation
BaLi_c21370	<i>narI1</i>	Nitrat-Reduktase (gamma Untereinheit)
BaLi_c21380	<i>narJ1</i>	Nitrat-Reduktase (delta Untereinheit)
BaLi_c21390	<i>narH1</i>	Nitrat-Reduktase (beta Untereinheit)
BaLi_c21400	<i>narG1</i>	Nitrat-Reduktase (alpha Untereinheit)
BaLi_c21460	<i>fnr</i>	Transkriptionsregulator (FNR/CAP Familie)
BaLi_c21470	<i>narK</i>	Nitrit-Extrusion-Permease
BaLi_c28730	<i>narI2</i>	Nitrat-Reduktase (gamma Untereinheit)
BaLi_c28740	<i>narJ2</i>	Nitrat-Reduktase (delta Untereinheit)
BaLi_c28750	<i>narH2</i>	Nitrat-Reduktase (beta Untereinheit)
BaLi_c28760	<i>narG2</i>	Nitrat-Reduktase (alpha Untereinheit)
BaLi_c28770		Nitrat/Nitrit-Transporter
BaLi_c05030	<i>nasB</i>	assimilatorische Nitrat-Reduktase (Elektronentransfer-Untereinheit)
BaLi_c05040	<i>nasC</i>	assimilatorische Nitrat-Reduktase (katalytische Untereinheit)
BaLi_c05050	<i>nasD</i>	assimilatorische Nitrit-Reduktase Untereinheit
BaLi_c05060	<i>nasE</i>	assimilatorische Nitrat-Reduktase Untereinheit
BaLi_c05070	<i>nasF</i>	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase
BaLi_c03810	<i>nasA</i>	Nitrat-Transporter

Dissimilatorische Nitrat-Reduktasen nutzen Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor in der Atmungskette. Diese Reaktion stellt den ersten Schritt in der Denitrifikation dar (González, et al., 2006). Vertreter der Spezies *B. licheniformis* wurden in der Literatur als Denitrifikanten beschrieben (Pichinoty, et al., 1978). *B. licheniformis* DSM13, ein bereits sequenzierter Vertreter der Spezies *B. licheniformis*, weist nicht die Fähigkeiten für eine vollständige Denitrifikation auf, da dieser lediglich eine dissimilatorische Nitrat-Reduktase besitzt und ihm die Gene für die Enzyme zur weiteren Umsetzung des Nitrits zu molekularem Stickstoff fehlen (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004)

Die Gene für die Umsetzung des Nitrit zu molekularem Stickstoff konnten auch in *B. licheniformis* 9945A nicht entdeckt werden. Im Gegensatz zu *B. licheniformis* DSM13 weist *B. licheniformis* 9945A zwei dissimilatorische Nitrat-Reduktasen auf (siehe Abb. 3.23).

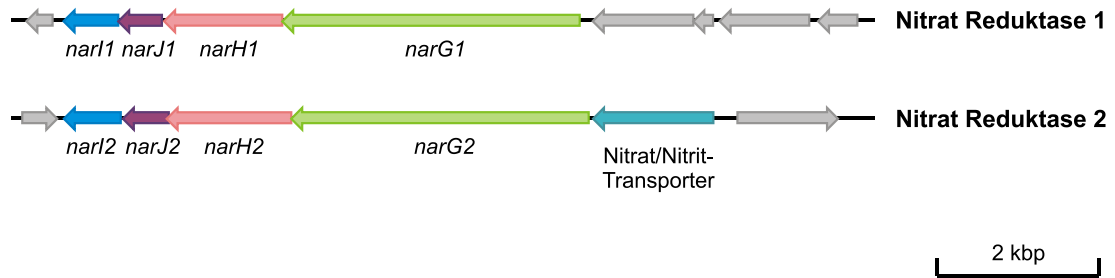


Abb. 3.23: Genetische Organisation der Nitrat-Reduktase 1 und 2 in *B. licheniformis* 9945A: Gene sind als Pfeile gekennzeichnet, die die Leserichtung wiedergeben; orthologe Gene sind in gleicher Farbe dargestellt; graue Pfeile stellen flankierende Gene dar.

Nitrat-Reduktase 1 zeigt hohe Ähnlichkeit zum orthologen Gencluster aus *B. licheniformis* DSM13. Die Identität liegt hierbei zwischen 97 % und 99 % auf Basis der AS-Sequenz. In unmittelbarer Nähe dieses Genclusters konnten das Gen des Fnr Transkriptionsregulators und eines potentiellen Nitrat/Nitrit-Transportproteins identifiziert werden. Der Transkriptionsregulator Fnr ist ein wichtiger Bestandteil der Regulationskaskade des anaeroben Wachstums (Reents, et al., 2006). Sequenzvergleiche der Nitrat-Reduktase 2 offenbarten Übereinstimmungen mit einer Nitrat-Reduktase aus *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (Feng, et al., 2007). Die Identitäten lagen hierbei zwischen 42 % und 76 % auf Basis der AS-Sequenz. Darüber hinaus ist ein Nitrat/Nitrit-Transporter mit diesem System assoziiert (siehe Abb. 3.23). Nitrat-Reduktase 2 wurde durch das Programm "Island Viewer" als mögliches Fremdgen identifiziert (siehe 3.4.4). Die Gene beider Nitrat-Reduktasen sind in gleicher Weise angeordnet, lediglich die direkte Assoziation des Nitrat/Nitrit-Transporters unterscheidet beide Nitrat-Reduktase-Gencluster voneinander (siehe Abb. 3.23). Auch in *G. thermodenitrificans* NG80-2 ist der Nitrat/Nitrit-Transporter nicht mit diesem Nitrat-Reduktase-Gencluster assoziiert (Feng, et al., 2007). *G. thermodenitrificans* NG80-2 besitzt ebenso wie *B. licheniformis* 9945A zwei dissimilatorische Nitrat-Reduktase Gencluster.

Die Gene der assimilatorischen Nitrat-Reduktase entsprechen zu einem hohen Grad den orthologen Genen aus *B. licheniformis* DSM13. Die Identitäten liegen dabei über 90 % auf Basis der AS-Sequenz. In Anordnung und Auftreten der Gene in diesem Gencluster konnte kein Unterschied zu *B. licheniformis* DSM13 entdeckt werden.

3.4.11. Antibiotika und sekundäre Metabolite

Die Produktion von Antibiotika und sekundären Metaboliten spielt eine wichtige Rolle in Mikroorganismen. Durch die Sekretion dieser Substanzen erhalten die Produzenten in vielen Fällen Wachstumsvorteile gegenüber Konkurrenten. Eine wichtige Quelle solcher Substanzen sind Nicht-Ribosomale-Peptid-Synthetasen (NRPS) und Polyketid-Synthetasen (PKS). In *B. amyloliquefaciens* FZB42 nehmen diese Biosynthese-Cluster 8,5 % des Gesamtgenoms ein (Chen, et al., 2007). NRP-Synthetasen zeichnen sich vor allem durch ihre Größe von mehreren Tausend Aminosäuren und ihrer Organisation in Clustern von bis zu elf Modulen aus (Finking and Marahiel, 2004). Weitere antibiotisch-aktive Substanzen, die in Vertretern der Gattung *Bacillus* gefunden wurden, sind Lantibiotika. Es handelt sich dabei um eine Gruppe von ribosomal-synthetisierten und posttranslational-modifizierten Bakteriozin-Peptiden, die seltene Aminosäuren enthalten (McAuliffe, et al., 2001). Diese können dehydratisiert oder versehen mit Lanthionin-Gruppen vorliegen.

Im Zuge der Annotation konnten drei NRPS-Gencluster und ein Gencluster für die Biosynthese von Lantibiotika im Genom von *B. licheniformis* 9945A identifiziert werden (siehe Tab. 3.8 und Tab. 3.9). Gencluster für die Synthese von Polyketiden konnten nicht entdeckt werden.

Tab. 3.8: Auflistung der Gene des Lantibiotika-Genclusters

Gennummer	Gen	Annotation	Anzahl AS
BaLi_c01740	<i>lanP</i>	intrazelluläre Serin-Protease	467
BaLi_c01750		hypothetisches Protein	252
BaLi_c01760		hypothetisches Protein	232
BaLi_c01770		möglicher ABC Transporter (ATP-binde Protein)	301
BaLi_c01780	<i>lanR</i>	Transkriptionsregulator	77
BaLi_c01790	<i>lanE</i>	Lantibiotika-Immunitätsprotein	246
BaLi_c01800		möglicher ABC Transporter (Permease)	235
BaLi_c01810		möglicher ABC Transporter (ATP-binde Protein)	306
BaLi_c01820		hypothetisches Protein	100
BaLi_c01830	<i>lanT</i>	Lantibiotika Transportprotein	716
BaLi_c01840	<i>lanM1</i>	Lantibiotika Biosyntheseprotein	1030
BaLi_c01850		hypothetisches Protein	71
BaLi_c01860	<i>lanM2</i>	Lantibiotika Biosyntheseprotein	1097
BaLi_c01870		hypothetisches Protein	68

Der Gencluster für die Lantibiotika-Biosynthese setzt sich aus 14 Genen zusammen. Dazu gehören zwei potentielle Vorläuferpeptide (BaLi_c01850, BaLi_c01870), zwei modifizierende Enzyme (*lanM1*, *lanM2*) und eine Serin-Protease (*lanP*). Die Gene BaLi_c01750 - BaLi_c01770 und BaLi_c01800 - BaLi_c01830 kodieren vermutlich für Proteine, die in den Transport der Lantibiotika involviert sind. Darüber hinaus konnte ein Immunitätsgen (*lanE*) und ein transkriptioneller Regulator (*lanR*) identifiziert werden. Alle Gene dieses Genclusters werden in gleicher Orientierung abgelesen (siehe Abb. 3.24).

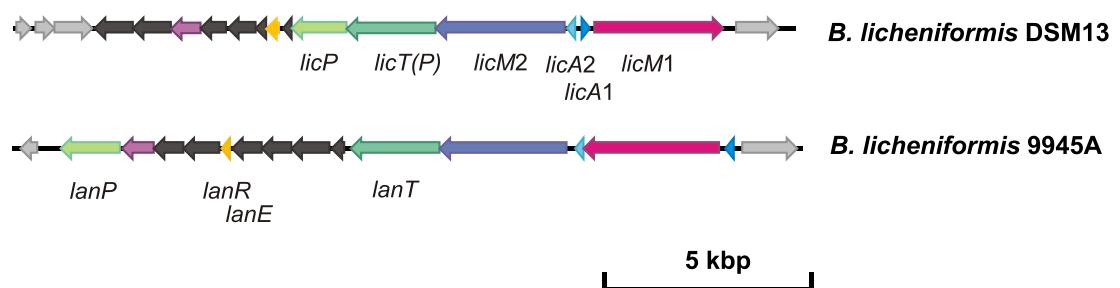


Abb. 3.24: Vergleich der Genomorganisation der Lantibiotika-Biosynthese-Cluster aus *B. licheniformis* 9945A und *B. licheniformis* DSM13: Gene sind als Pfeile gekennzeichnet, die die Leserichtung wiedergeben; orthologe Gene sind in gleicher Farbe dargestellt; hellgraue Pfeile stellen flankierende Gene dar, während dunkelgraue Pfeile Gene darstellen, die mit diesem Gencluster assoziiert sind, aber keine Orthologe in dem jeweils anderen Organismus besitzen.

Ein Vergleich der Genomorganisation der Lantibiotika-Biosynthese-Cluster aus *B. licheniformis* 9945A und *B. licheniformis* DSM13 offenbarte deutliche Unterschiede. Sechs Gene des Lantibiotika-Gen-Clusters aus *B. licheniformis* 9945A sind nicht in *B. licheniformis* DSM13 vorhanden, während die restlichen Gene zwar vorhanden sind, aber in einer anderen Organisation vorliegen. Insbesondere die Gene für die Biosynthese der Lantibiotika konnten in beiden Organismen identifiziert werden. Die Identitäten auf Basis der AS-Sequenz liegen für diese Gene unter 55 %. Die Übereinstimmungen der Propeptide BaLi_c01850 und BaLi_c01870 zu *licA1* und *licA2* aus *B. licheniformis* DSM13 liegen lediglich bei 46 % und 48 % auf Basis der AS-Sequenz. Das Lantibiotikum Lichenicidin aus *B. licheniformis* DSM13 geht auf diese Propeptide zurück und besitzt eine Aktivität gegenüber einer Vielzahl Gram-positiver Organismen, insbesondere gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (Dischinger, et al., 2009).

Neben einem Lantibiotika-Gencluster konnten drei NRPS-Gencluster identifiziert werden. Eine Auflistung der Gene der NRPS-Gencluster findet sich in Tab. 3.9.

Tab. 3.9: Auflistung der Gene der NRPS-Gencluster

Gennummer	Gen	Annotation	Anzahl AS
BaLi_c04140	<i>lchAA</i>	Lichenysin-Synthetase A	3582
BaLi_c04150	<i>lchAB</i>	Lichenysin-Synthetase B	3587
BaLi_c04170	<i>lchAC</i>	Lichenysin-Synthetase C	1282
BaLi_c04180	<i>lchAD</i>	Lichenysin-Synthetase D	255
BaLi_c22150		Nicht-Ribosomale Peptid-Synthetase (subunit E)	1267
BaLi_c22160		Nicht-Ribosomale Peptid-Synthetase (subunit D)	3596
BaLi_c22170		Nicht-Ribosomale Peptid-Synthetase (subunit C)	2546
BaLi_c22180		Nicht-Ribosomale Peptid-Synthetase (subunit B)	2564
BaLi_c22190		Nicht-Ribosomale Peptid-Synthetase (subunit A)	2551
BaLi_c26210	<i>bcrC</i>	Bacitracin Transporter (Permease)	203
BaLi_c26220	<i>bcrB</i>	Bacitracin Transporter (Permease)	244
BaLi_c26230	<i>bcrA</i>	Bacitracin Transporter (ATP-binde Protein)	313
BaLi_c26260	<i>bacC</i>	Bacitracin synthetase 3	6359
BaLi_c26270	<i>bacB</i>	Bacitracin synthetase 2	2607
BaLi_c26280	<i>bacA</i>	Bacitracin synthetase 1	5256
BaLi_c26290		mögliche Thioesterase	234

Der Lichenysin-Biosynthese-Cluster setzt sich aus vier Genen zusammen, die in gleicher Richtung abgelesen werden. Diese Gene finden sich als Orthologe auch im Genom von *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 wieder (siehe Abb. 3.19 BiBaG).

Ein weiterer NRPS-Gencluster kodiert für die Enzyme, die in die Bacitracin-Biosynthese involviert sind (siehe Tab. 3.9). Bacitracin ist ein zyklisches Dodecylpeptid-Antibiotikum. Es blockiert die Zellwandsynthese durch Komplexbildung mit C₅₅-Isoprenyl-Pyrophosphat, einem Intermediat der Peptidoglykan-Synthese (Qi, et al., 2008, Stone and Strominger, 1971). Dadurch wird die Wiederverwertung des Lipid-Trägermoleküls verhindert, was die Zellwand-Polymer-Biosynthese inhibiert. Die Produkte der Gene *bacABC* sind für die Synthese des Bacitracins zuständig. BaLi_c26290 kodiert für eine potentielle Thioesterase. Die Produkte der Gene *bcrABC* kodieren für einen Bacitracin-Transporter, der mit die-

sem System assoziiert ist. Sowohl die Biosynthese- als auch die Transportgene zeigen einen sehr hohen Grad der Übereinstimmung mit einem bereits funktionell charakterisierten Bacitracin-System in *B. licheniformis* ATCC 10716 (Konz, et al., 1997, Podlessek, et al., 1995). Die Übereinstimmung der Bacitracin Synthetasen beider Systeme liegt zwischen 98 % und 99 % auf AS-Ebene. BiBaG-Analysen zeigten, dass dieser Cluster weder in *B. subtilis* 168 noch in *B. licheniformis* DSM13 vorliegt (siehe Abb. 3.19).

Der dritte NRPS-Cluster (BaLi_c22150 - BaLi_c22190) zeigt die größte Divergenz der drei NRPS-Gencluster zu bekannten NRPS-Systemen. Blast-Analysen auf Basis der AS-Sequenz offenbarten eine Verwandtschaft zu den Genen der Fengycin-Biosynthese aus *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Chen, et al., 2007, Chen, et al., 2009). Die Identität liegt dabei zwischen 69 % und 73 % auf Basis der AS-Sequenz. In *B. licheniformis* DSM13 ist dieser Cluster nicht zu finden (siehe Abb. 3.19 BiBaG). Dieser besitzt aber schwache Ähnlichkeit zum Plipastatin-Gencluster aus *B. subtilis* 168. Hinsichtlich seiner Genreihenfolge weicht dieser NRPS-Cluster nicht von der des Fengycin-Biosynthese-Clusters aus *B. amyloliquefaciens* FZB42 ab.

Weitere Wachstumsvorteile stellen Resistenzen gegenüber Anitibiotika dar. *B. licheniformis* 9945A besitzt ein Gen (BaLi_c28970), das für eine rRNA Adenin N-6-Methyltransferase kodiert. Dieses Enzym vermittelt eine Resistenz gegenüber Erythromycin. Die AS-Sequenz dieses Enzyms stimmt mit einer rRNA Adenin N-6-Methyltransferase aus *B. licheniformis* zu 100 % überein (Gryczan, et al., 1984). Konjugationstests mit dem Vektor pKVM1 bestätigten die Erythromycin-Resistenz des Stammes *B. licheniformis* 9945A (Daten nicht aufgeführt).

4. Diskussion

4.1. DNA-Transfer in *B. licheniformis*

B. licheniformis stellt aufgrund seiner industriellen Bedeutung ein interessantes Objekt für die Stammoptimierung dar. Gerichtete Mutagenese spielt hierfür eine wichtige und zentrale Rolle. Eine Voraussetzung hierfür sind schnelle und effiziente DNA-Transfer-Systeme.

4.1.1. Elektroporation in *B. licheniformis*

Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur Elektroporation von *B. licheniformis* MW3 stellt eine Methode dar, die diese Voraussetzungen liefert. Neben dem Verzicht auf die Herstellung von Protoplasten stellt vor allem die Lagerung der elektrokompenten *B. licheniformis* MW3 Zellen bei - 80 °C einen deutlichen Vorteil dar. Ein wichtiger Faktor für die Transformation durch Elektroporation stellen osmotisch aktive Substanzen in allen Puffer- und Mediumssystemen dar. Xue, et al., 1999 konnten bereits für Vertreter der Spezies *B. subtilis* und *B. licheniformis* zeigen, dass durch eine erhöhte Osmolarität eine gesteigerte Effizienz nachweisbar war. Dieses Protokoll ließ sich aber nicht auf *B. licheniformis* MW3 übertragen. Auf Basis dieses Protokolls wurde an einer erfolgreichen Elektroporation von *B. licheniformis* MW3 gearbeitet. Die osmotisch-stabilisierenden Substanzen Sorbitol und Saccharose standen dabei im Vordergrund (siehe 3.1.1). Für die Anzucht wurde Antibiotika Bouillon mit Saccharose verwendet, während für die Regeneration LB-Medium mit Sorbitol eingesetzt wurde. Der Elektroporationspuffer orientierte sich an dem Protokoll nach Dunny, et al., 1991. Dieser Elektroporationspuffer enthielt ebenfalls Saccharose, so dass die Zellen von Anfang bis Ende der Elektroporationsprozedur osmotisch-stabilisiert wurden. Letztendlich konnte durch Einsatz osmotisch-stabilisierender Substanzen *B. licheniformis* MW3 erfolgreich elektroporiert werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass Osmolarität einen wichtigen Einfluss auf die Herstellung elektrokompenter *B. licheniformis* MW3 Zellen hat. Insbesondere während der Elektroporation wird die Integrität der Zellwand beeinträchtigt, was zu einem Absterben der Zelle führen kann (Tsong, 1991).

Neben der Zusammensetzung der Medien und Puffer spielte der Erntezeitpunkt der Zellen während der Wachstumsphase eine entscheidende Rolle. Nach einer einmaligen Verdoppelung der optischen Dichte nach Inokulation konnten Zellen für eine erfolgreiche Elektroporation abgeerntet werden (siehe Abb. 3.1). Dies bedeutet, dass in etwa zum Zeitpunkt nach der ersten Zellteilung elektrokompetente Zellen reproduzierbar detektiert werden konnten. Die Elektroporation konnte nach drei Tagen mit dem Nachweis des transformierten Plasmides abgeschlossen werden.

4.1.2. Konjugation in Vertreter der Gattung *Bacillus*

Neben DNA-Transfer-Methoden durch chemische oder elektrische Stimulation sind Methoden unter Ausnutzung natürlicher Bedingungen eine gute Alternative. Dazu gehört neben der natürlichen Kompetenz vor allem die Konjugation. Für den DNA-Transfer nach *B. licheniformis* stehen derzeit zwei Systeme zur Auswahl. Dazu gehört die pLS20 vermittelte Konjugation, die einen DNA-Transfer zwischen Gram-positiven Bakterien vermittelt (Itaya, et al., 2006). Diese Methode stellt letztlich nur eine Verlagerung des Problems dar, da in diesem Fall statt des Akzeptorstamms der Donorstamm transformiert werden muss.

Eine weitere Möglichkeit stellt die IncP-vermittelte Konjugation dar (Pansegrau, et al., 1994). *E. coli* wird in diesem Fall als Donorstamm verwendet, was eine vereinfachte Konstruktion zur Folge hat. IncP-Plasmide können auf Gram-negative und Gram-positive Organismen übertragen werden (Heinemann and Sprague, 1989, Trieu-Cuot, et al., 1987, Waters, 2001). Durch ihr breites Übertragungsspektrum eignen sie sich sehr gut für den DNA-Transfer nach Gram-positiven Bakterien. Durch die Übertragung des *oriT* mit dem dazugehörigen *traJ* konnte in dieser Arbeit der bereits etablierte Mutagenesevektor pMAD für eine konjugative Übertragung mobilisiert werden (siehe 3.1.2). Für die daraus resultierenden pKVM-Vektoren konnte gezeigt werden, dass sie auf *B. licheniformis* und *B. subtilis* Spezies übertragen werden konnten (siehe Tab. 3.1). Diese Methode besitzt den Vorteil, dass sie in kurzer Zeit und ohne Regenerationsphase durchgeführt werden kann. Darüber hinaus ist auch eine größenunabhängige Übertragung ein entscheidender Vorteil, der vor allem in der Konstruktion von Insertionen eine wichtige Rolle spielt. In dieser Arbeit konnte ein 17,7 kbp Insertionsvektor erzeugt werden, der per Konjugation übertragen und mit dessen Hilfe eine Insertion des Urease-Clusters erzeugt werden konnte (siehe 3.3). Elektroporation oder auch Transformation von Proto-

plasten wären aufgrund ihrer geringeren Effizienzen hierfür keine adäquaten Methoden gewesen. Für die Erstellung eines Optimalgenomes bei nicht-natürlich kompetenten Organismen ist Konjugation derzeit die Methode der Wahl für den DNA-Transfer.

Um konjugative Vektoren der pKVM-Serie breiter einsetzen zu können, wurden neue Vektoren mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen erzeugt. Dazu gehörten die Vektoren pKVM2 und pKVM3 (siehe Abb. 3.3). Diese besitzen zum einen ausschließlich Tetrazyklin-Resistenz und zum anderen Tetrazyklin- und Ampicillin-Resistenz in Kombination. Die Tetrazyklin-Resistenz stammt ursprünglich aus dem Transposon Tn916 (Bertram, et al., 1991). Es wurde gezeigt, dass dieses Transposon sowohl auf Gram-positive als auch auf Gram-negative Bakterien übertragen werden kann. Die TetM-vermittelte Tetrazyklin-Resistenz besitzt das größte Wirtsspektrum aller bisher identifizierten Tetrazyklin-Resistenzen (Roberts, 2005) und war daher bestens geeignet für die Modifikation des pKVM1 Vektors. Bei TetM handelt es sich um ein Ribosomen-Schutz-Protein (Chopra and Roberts, 2001). Das Antibiotikum Tetrazyklin bindet an die Ribosomen und verhindert so die Elongationsphase der Proteinbiosynthese (Chopra and Roberts, 2001). Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem Elongationsfaktor EF-G kann TetM an die Ribosomen binden und vermittelt durch eine Konformationsänderung die Resistenz gegenüber Tetrazyklin. Die Resistenz gegenüber Erythromycin, die ebenfalls im pKVM-System Anwendung findet, erfolgt über eine Adenosin-Methylierung der 23S rRNA. Durch die Methylierung wird verhindert, dass sich eine Wasserstoffbindung zwischen der 23S-rRNA und Erythromycin ausbildet (Maravić, 2004). Dabei handelt es sich um eine dauerhafte Modifikation im Gegensatz zur TetM vermittelten Tetrazyklin-Resistenz. TetM bindet an die Ribosomen und sorgt durch einen allosterischen Mechanismus für die Dissoziation des Tetrazyklins von den Ribosomen (Connell, et al., 2003). Dies könnte auch eine Erklärung für den Unterschied in den Konjugationseffizienzen zwischen pKVM1 und pKVM2 nach *B. licheniformis* MW3 sein (siehe Tab. 3.1). Die Abweichung der Konjugationseffizienzen um den Faktor 10 könnte auf den Unterschied in der Effektivität der beiden Antibiotika-Resistenzen zurückzuführen sein.

Des Weiteren konnte durch den Austausch der Resistenzgene das *pre* Gen deletiert werden (siehe Abb. 3.3). Gennaro, et al., 1987 haben gezeigt, dass das Pre-Protein durch eine RecA-unabhängige Rekombination eine Integration des Plasmides ins Chromosom vermitteln kann. Da die Vektoren der pKVM-Reihe als

Mutagenesevektoren eingesetzt werden, kann diese Eigenschaft Fehlintegrationen des Vektors ins Chromosom verursachen, was letztlich den Ablauf der Mutagenese stören kann. Für die Plasmidintegrität ist das Pre-Protein nicht notwendig (Gennaro, et al., 1987).

4.1.3. *in vivo*-Methylierung

Ein zuverlässiges System für den DNA-Transfer greift aber nur soweit, wie keine bakterieneigenen Mechanismen vorhanden sind, die dies verhindern können. RM-Systeme stellen in vielen Fällen Barrieren dar, die die DNA-Aufnahme behindern (Wilson and Murray, 1991). *B. licheniformis* MW3 besitzt im Gegensatz zu *B. licheniformis* DSM13 deutlich höhere Transformationseffizienzen, da in diesem Stamm beide RM-Systeme deletiert wurden, die *B. licheniformis* DSM13 als Wildtyp noch besitzt (Waschkau, et al., 2008). Für *B. licheniformis* MW3 konnte neben einem Elektroporations- auch ein Konjugationssystem entwickelt und etabliert werden (siehe 3.1.1 und 3.1.2). Jedoch war die Übertragung der beiden DNA-Transfer-Systeme, die bei *B. licheniformis* MW3 Anwendung fanden (Elektroporation und Konjugation), auf *B. licheniformis* H1 nicht möglich. Zu Beginn der Arbeit mit diesem Stamm stand daher die Identifizierung von RM-Systemen. Es wurde nach DNA-Methyltransferasen und Nukleasen gesucht, die in einem genetischen Kontext zueinander standen. Es konnten zwei Systeme identifiziert werden, deren Komponenten zwar nicht direkt miteinander assoziiert vorlagen, aber aufgrund ihrer Sequenzhomologien als DNA-Methyltransferasen und potentielle Endonukleasen identifiziert wurden (siehe 3.1.3). Wegen der räumlichen Trennung durch zwei bzw. drei ORFs handelt es sich vermutlich um zwei separate Enzyme (siehe Abb. 3.4). Aufgrund dieser Organisation wurden die Enzyme beider RM-Systeme als unabhängig agierende Enzyme eingestuft. Daher wurden diese Systeme nach der Einteilung von Roberts, et al., 2003 in die Gruppe der TypII-RM-Systeme eingeordnet. Aufgrund von Blast-Analysen konnten die DNA-Methyltransferasen als mögliche cytosinspezifische DNA-Methyltransferasen identifiziert werden. Durch die Klonierung der beiden DNA-Methyltransferasen und deren Einsatz in der *in vivo*-Methylierung konnte in Konjugations- und Elektroporationsexperimenten gezeigt werden, dass diese DNA-Methyltransferasen eine wichtige Rolle beim Schutz der DNA vor endogenen Endonukleasen in *B. licheniformis* H1 spielen (siehe 3.1.3). Transformationsexperimente mit den beiden *in vivo*-Methylierungsvektoren pIMV1 und pIMV2 in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen zeigten, dass pIMV2 nicht in

mcrABC und *mrr* positive Stämme transformiert werden kann. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass DNA-Methyltransferase 1 ein Methylierungsmuster erzeugt, das von *E. coli* eigenen methylierungsabhängigen Endonukleasen angegriffen wird. Das Mrr-Enzym offenbart Aktivität gegenüber N6-Methyladenin enthaltende DNA, während McrA und McrBC Veränderungen an Cytosinbestandteilen der DNA erkennen können, speziell 5-Methylcytosin, 5-Hydroxymethylcytosin und N4-Methylcytosin (Kelleher and Raleigh, 1991, Waite-Rees, et al., 1991). Aufgrund von Sequenzhomologien zu cytosinspezifischen DNA-Methyltransferasen erfolgte vermutlich ein Angriff der Endonukleasen McrA und McrBC auf durch DNA-Methyltransferase 1 methylierte DNA. Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, müssen weitere Tests herangezogen werden. Hierfür ist die Bisulfit-Methode nach Hayatsu, et al., 2007 eine geeignete Methode, die eine Untersuchung von Cytosin-Methylierungsmuster ermöglicht. Indem methylierte DNA mit Bisulfit inkubiert wird, erfolgt eine Konversion aller nicht-methylierten Cytosine zu Uracil. Diese Umwandlung kann anschließend mittels Sequenzierung und Vergleich mit der ursprünglichen Sequenz detektiert werden. Letztlich können durch dieses Verfahren Rückschlüsse auf die Erkennungssequenzen der Endonukleasen gewonnen werden.

Neben den beiden RM-Systemen, die auf unmethylierte DNA reagieren, haben Transformationsversuche ebenfalls gezeigt, dass eine weitere Barriere die Aufnahme von DNA behindert. Eine Elektroporation mit DNA-Methyltransferase 1_{*E. coli*}/DNA-Methyltransferase 2- und Dam/Dcm-methylierter DNA in *B. licheniformis* H1 zeigte, dass diese trotz stammspezifischer Methylierung angegriffen wurde. Die Beobachtung stützte die These, dass Dam- und Dcm-Methylierung ebenso eine Rolle bei der DNA-Aufnahme in *B. licheniformis* H1 spielt. In Folge dieser Elektroporationsversuche konnte ein ca. 3,7 kbp großes Plasmid detektiert werden (siehe Abb. 3.6). Die Tatsache, dass die Klone, die dieses Plasmid enthielten, Erythromycin-resistent waren, legte die Vermutung nahe, dass es sich hier um einen Teil des Vektors pKVM1 handelt. Da dieses Plasmid in *Bacillus* replizieren konnte, handelte es sich vermutlich um den pE194 Bereich (*oriR* pE194ts, *pre*, *ery*) des Vektors pKVM1.

Um dieses Methylierungsmuster zu umgehen, wurde ein *dam* und *dcm*-negativer *E. coli* Stamm verwendet (siehe 3.1.3). Elektroporationsversuche mit *in vivo*-methylierter DNA zeigten, dass in diesem Fall kein Abbau mehr stattfand. Dies bestärkte die Vermutung, dass *B. licheniformis* H1 eine methylierungsabhängige

Endonuklease besitzt. Betrachtet man sich die Verteilung der Dam und Dcm-Methylierungspositionen auf pKVM1, stellt man fest, dass Dam 36 Methylierungsbereiche hat, die gleichmäßig über das Plasmid verteilt sind (siehe Abb. 4.1). Im Gegensatz dazu besitzt pKVM1 lediglich 13 Dcm-Methylierungspositionen, die ungleichmäßig verteilt sind und vermehrt außerhalb des pE194-Bereiches auftreten (siehe Abb. 4.1). Bringt man das Auftreten des 3,7 kbp Plasmids in Einklang mit der Verteilung der Dcm-Methylierungspositionen, liegt der Verdacht nahe, dass es sich um eine methylcytosinabhängige Endonuklease handelt.

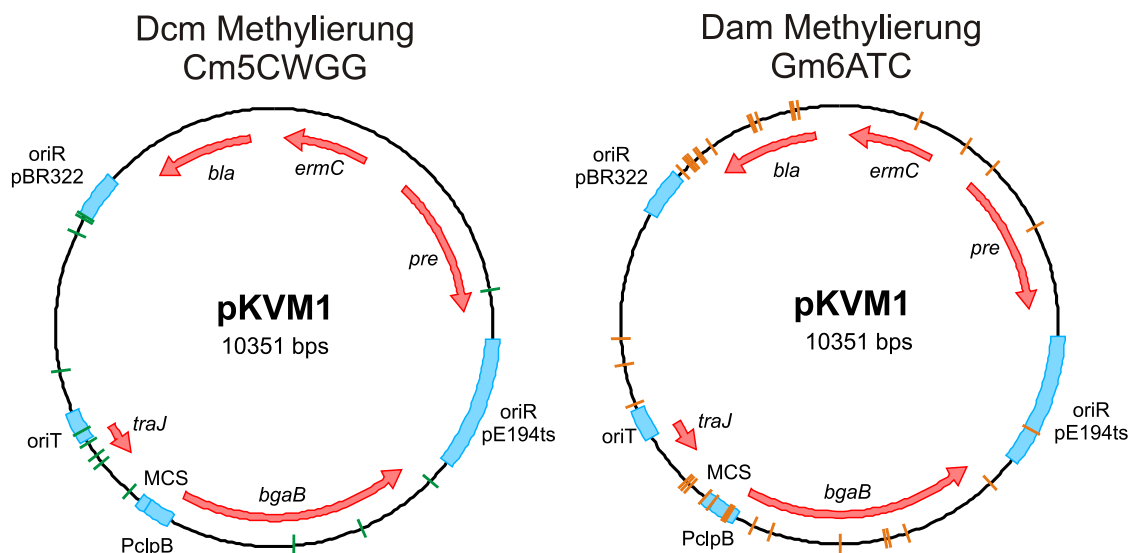


Abb. 4.1: Grafische Darstellung Verteilung der Dam und Dcm-Methylierungsbereiche auf pKVM1

Das McrBC-System für methylierungsabhängige Restriktion in *E. coli* schneidet DNA zwischen zwei Erkennungsstellen, die einen Abstand zwischen 40 und 3000 bp aufweisen können. Die Restriktion erfolgt dabei nahe an einer der beiden Methylierungspositionen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der DNA-Translokation (Dryden, et al., 2001). Geht man in diesem Fall von einer analogen Funktionalität der methylierungsabhängigen Endonuklease aus *B. licheniformis* H1 aus, könnte dies eine Erklärung für das Auftreten des 3,7 kbp Plasmids sein.

Eine Blast-basierte Suche mit Sequenzen der methylierungsabhängigen Restriktionssysteme *mrr* und *mcrABC* aus *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien im Genom von *B. licheniformis* H1 führte zu keinem Ergebnis. Vermutlich handelt

es sich um ein System, dass sich von denen Gram-negativer Bakterien deutlich unterscheidet.

Letztlich führte die *in vivo*-Methylierung mit dem Vektor pIMV2 und die Verwendung eines *dam*- und *dcm*-negativen *E. coli* Stammes zu einer erfolgreichen Transformation von *B. licheniformis* H1 mit einem Shuttle-Vektor-System (siehe Abb. 3.7). DNA-Transfer ohne die Anpassung des Methylierungsmusters führte in keinem Fall zu einem positiven Ergebnis. Dies legte die Vermutung nahe, dass RM-Systeme in *B. licheniformis* H1 effektive Endonukleasen beinhalten. Vor allem eine Charakterisierung dieser beiden Endonukleasen ist von Interesse. Um diese heterolog in *E. coli* exprimieren zu können, muss sichergestellt werden, dass *E. coli* eigene DNA nicht hydrolysiert wird. Durch Einsatz des Methylierungsvektors pIMV2 kann das *B. licheniformis* H1 spezifische Methylierungsmuster auf *E. coli* übertragen werden, was letztlich eine heterologe Expression der Endonukleasen möglich machen sollte. Da es sich bei beiden Endonukleasen vermutlich um TypII-RM-Endonukleasen handelt, erfolgt die Hydrolyse der DNA entweder in der Erkennungssequenz oder in ihrer unmittelbaren Umgebung. Dies macht diese Endonukleasen interessant für die biotechnologische Nutzung.

Für eine bessere Handhabung im DNA-Transfer stellt die Deletion der beiden Endonukleasen einen wichtigen Schritt der Stammoptimierung von *B. licheniformis* H1 dar. Durch Deletion dieser Enzyme sollte der DNA-Transfer in *B. licheniformis* H1 deutlich vereinfacht werden. Wie sich zeigte, besitzt *B. licheniformis* H1 ebenso ein TypIV-RM-System, das eine methylierungsabhängige Hydrolyse der DNA vermittelt. Dieses System stellt auch nach Deletion der beiden Endonukleasen eine wirksame Barriere dar, weshalb auch anschließend auf die Verwendung eines *dam* und *dcm* negativen *E. coli* Stammes nicht verzichtet werden kann. Um auch diese Barriere zu entfernen, ist eine Identifizierung der methylierungsabhängigen Endonuklease notwendig. Dies kann durch einen kombinierten Ansatz aus Transposonmutagenese und Transformationsexperimenten erfolgen. Transposonmutagenese als ungerichtete Methode zur Erzeugung von Mutationen würde der Inaktivierung der methylierungs-abhängigen Endonuklease dienen. Anschließende Transformationsexperimente mit *Dam*- und *Dcm*-methylierter DNA würden dabei helfen, die gesuchte Transposante zu identifizieren. Durch Identifizierung des Transposon-Insertionslocus kann schließlich das entsprechende Gen entdeckt werden.

Ein DNA-Transfer durch Konjugation auf *B. licheniformis* H1 wird daher erst möglich sein, wenn Teile der RM-Barriere entfernt worden sind. Lediglich der Vektor pIMV1 kann im Konjugationsstamm *E. coli* S17-1 eingesetzt werden. Da DNA-Methyltransferase 1 nicht in *mrr* und *mcrABC*-positiven Stämmen eingebracht werden kann, ist ein Einsatz des Vektors pIMV2 in *E. coli* S17-1 nicht möglich. *E. coli* CA434 macht einen Einsatz der pIMV-Vektoren durch seine Kanamycin-Resistenz nicht möglich. Des Weiteren behindert die methylierungsabhängige Endonuklease den Einsatz der *E. coli* Stämme S17-1 und CA434 in Konjugationsexperimenten nach *B. licheniformis* H1, da beide Stämme über Dam- und Dcm-DNA-Methyltransferasen verfügen. Letztlich macht erst ein "Knock-Out" der methylierungsabhängigen Endonuklease und der Endonuklease des RM-Systems 1 einen Einsatz der Konjugationsvektoren pKVM1-3 in *B. licheniformis* H1 möglich.

4.2. Mutagenese in *B. licheniformis*

Aufgrund seiner nur schwach ausgeprägten natürlichen Kompetenz gestaltet sich die Erzeugung von Mutationen in *B. licheniformis* schwieriger als in *B. subtilis*. Bisher etablierte Methoden zur Einführung von Mutationen, speziell von markerfreien Deletionen in *B. subtilis*, setzen natürliche Kompetenz voraus (Yan, et al., 2008, Yu, et al., 2010). Dadurch ist die Konstruktion und die Transformation der Deletionskassetten für lineare DNA ausgelegt und kann nicht ohne Weiteres auf nicht-natürlich kompetente Stämme übertragen werden. Diese Methoden sind für domestizierte Laborstämme ausgelegt, die exogene DNA einfach aufnehmen und integrieren (Nijland, et al., 2010). Dagegen besitzen viele aus der Umwelt stammende Stämme diese Eigenschaften nicht. Dies trifft ebenso auf *B. licheniformis* DSM13 zu, der mit seiner geringen natürlichen Kompetenzrate nicht an Laborbedürfnisse angepasst ist. Für solche Stämme benötigt man plasmidbasierte Methoden zur Einführung von Mutationen. Methoden wie sie Yan, et al., 2008 und Yu, et al., 2010 vorgestellt haben, eignen sich daher nur eingeschränkt für den Einsatz in *B. licheniformis* DSM13. Eine Anwendung ist nur möglich durch exogene Induktion der natürlichen Kompetenz. Nijland, et al., 2010 konnten durch Überexpression des Kompetenzregulators ComK zeigen, dass die natürliche Kompetenz in nicht-natürlich kompetenten *B. subtilis* Stämmen induziert und für Mutageneseexperimente verwendet werden konnte. Eine Übertragung dieses Systems auf *B. licheniformis* DSM13 war nicht möglich. Letztlich bedeutet der Einsatz

eines *comK*-Expressionsplasmids lediglich eine Verlagerung des Problems. Für die Erzeugung von markerfreien Deletionen in *B. licheniformis* stehen derzeit nur plasmidkodierte Systeme zur Verfügung. Neben pE194 und pSKE194 bietet der Vektor pMAD derzeit die besten Voraussetzungen für die Erzeugung markerfreier Deletionen in *B. licheniformis*. Der Vektor pMAD konnte erfolgreich in *B. licheniformis* H1 eingesetzt werden (siehe 3.2.2). Durch seinen Einsatz ließ sich eine 500 bp-Deletion im Gen Bh02419 erzeugen. Die Verwendung der konjugativen Vektoren pKVM1-3 war in diesem Stamm bisher nicht möglich, da eine Reihe von Faktoren deren Einsatz für die Konjugation behinderten. Um diese konjugativ übertragen zu können, sind Modifikationen notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten (siehe 4.1). Für den Einsatz in *B. licheniformis* MW3 verbinden die Vektoren pKVM1-3 eine einfache und schnelle Übertragung mit einem effizienten Mutagenesesystem. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion auch größerer Genombereiche in *B. licheniformis* MW3 möglich ist (siehe 3.2.1). Für die Erzeugung einer Deletion wurden von Beginn der Konstruktion bis zum Nachweis der Deletion mindestens 18 Tage benötigt (siehe Abb. 2.3). Nicht zuletzt die Verwendung der Konjugation ermöglichte einen schnellen und effizienten DNA-Transfer. Yu, et al., 2010 zeigten, dass durch die Verwendung von Gegenselektionsmarkern die Deletionsprozedur deutlich verkürzt werden kann. Dieses Zeitersparnis ist aber nur dadurch möglich, dass die Erzeugung der komplexeren Deletionskassette PCR-basiert erfolgen konnte. Für plasmidkodierte Systeme würde die Zeitersparnis teilweise durch eine längere Konstruktionszeit kompensiert werden. Dennoch ist die Verwendung eines Gegenselektionsmarkers in Betracht zu ziehen, da dadurch die Abhängigkeit von "Screening"-Verfahren reduziert wird. Speziell die *mazF*-Kassette, wie sie von Yu, et al., 2010 verwendet wurde, ist hierfür eine gute Wahl, da der Einsatz dieser Kassette keine weitere Modifikation des Arbeitsstammes notwendig macht. Der Einsatz im Vektor pKVM2 würde ein sicheres und stabiles System für die Erzeugung von markerfreien Deletionen in *B. licheniformis* darstellen. Durch seine Größe und seine Ausstattung besitzt pKVM2 das Potential auch für die Konstruktion von komplexeren Mutationskassetten, wie dies beispielweise für die Konstruktion des Insertionsvektors pKVM2 *ureAH ureT* gezeigt wurde (siehe 3.3). Darüber hinaus wurde in diesem Vektor das *pre*-Gen entfernt, dessen Genprodukt eine RecA-unabhängige Rekombination vermitteln kann (Gennaro, et al., 1987).

4.2.1. Markerfreie Deletion in *B. licheniformis*

Morimoto, et al., 2008 haben gezeigt, dass durch eine Genomreduktion von *B. subtilis* die Produktivität plasmidkodierter extrazellulärer Zellulasen und Proteasen deutlich anstieg. Es wurden 874 kbp deletiert, was einer Genomreduktion von 20 % entsprach. *B. licheniformis* wird als Produzent von Exoenzymen biotechnologisch eingesetzt. Eine gesteigerte Exoenzym-Produktion ist daher auch für diesen Organismus von großem Interesse. Ein erster Schritt in die Richtung eines Optimalgenomes durch Genomreduktion stellt die Deletion von Phagenbereichen dar. Lysogene Phagen behindern in vielen biotechnologischen Prozessen den Produktionsablauf, da sie ein Bakterium unter limitierenden Bedingungen lysieren können (Jones, et al., 2000). Darüber hinaus nehmen sie Ressourcen und Energie in Anspruch, die der Organismus anderweitig verwenden könnte.

Für die Deletion des PBSX-orthologen Phagen in *B. licheniformis* MW3 wurde der Vektor pKVM1 verwendet (siehe 3.1.2). Die Deletion erfolgte durch Austausch des Deletionsbereiches mit einer Deletionskassette durch ein Doppelrekombinationsergebnis (siehe 3.2.1). Aufgrund der Größe des zu deletierenden Bereiches konnten sehr viele positive Klone detektiert werden. Da bei der Deletion die Deletionskassette gegen den ursprünglichen Zustand ausgetauscht wurde, entstand ein Vektor, der über 40 kbp maß. Die Größe des Vektors am Ende der Erzeugung der Deletion sorgte vermutlich für einen schnellen Verlust des Plasmides. Dies gestaltet die Erzeugung von über 10 kbp Deletionen vermutlich einfacher als die weniger Kilobasenpaare. Die Erzeugung basierte auf einem modifizierten Protokoll von Arnaud, et al., 2004. Um die β -Galaktosidase-Aktivität während der Erzeugung der Deletion als Marker verwenden zu können, wurde *B. licheniformis* MW3 in NB-Medium mit Glukose angezogen, da bei einem Wachstum auf Glukose die *B. licheniformis* MW3 eigene β -Galaktosidase reprimiert wird (Armin Ehrenreich, persönliche Kommunikation). Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu dem von Arnaud, et al., 2004 entwickelten Protokoll dar. Insbesondere für β -Galaktosidase positive Stämme muss dieses Protokoll an den jeweiligen Stamm angepasst werden.

Die Deletion des PBSX-orthologen Phagen wurde schließlich auf das Auftreten eines veränderten Phänotyps untersucht. Die Mutante zeigte im Gegensatz zum Ausgangsstamm keine Lysogenie nach Zugabe von Mitomycin C während des

Wachstums in LB_{mod.}-Medium (siehe Abb. 3.12). In *B. subtilis* 168 wurde bereits gezeigt, dass nach einer Inaktivierung der strukturellen Gene *xkadG*, *xkdK* und *xkdM* deren Produkte nicht mehr im Exoproteom nachweisbar waren (Shingaki, et al., 2003). Auch eine Freisetzung der DNA in der Größe von 13 kbp, wie sie der PBSX Phage in sein Virion integriert, war in Überständen nicht mehr nachweisbar (Anderson and Bott, 1985, Shingaki, et al., 2003). Aufgrund der Tatsache, dass eine Phageninduktion durch Mitomycin C in *B. licheniformis* MW3.1 nicht mehr möglich war, wird dies vermutlich auf andere Stimuli ebenfalls zutreffen. Insbesondere der Nachweis von Hüllproteinen des PBSX-orthologen Phagens unter Mangelbedingungen, wie dies Voigt, et al., 2009 zeigten, wird für diesen Stamm nicht mehr möglich sein.

Ein weiteres Anwendungsgebiet dieses Stammes stellt sein Einsatz in der Untersuchung von Bakteriophagen dar. Der PBSX-Phage behinderte in vielen Fällen die Aufreinigung anderer Phagen aus Lysaten von *B. subtilis* (Harwood and Cutting, 1990). *B. licheniformis* MW3.1 stellt daher für die Untersuchung von lysogenen und lytischen Phagen in *B. licheniformis* einen guten Ausgangswirt dar, da keine Phagenpartikel mehr freigesetzt werden und so die Aufreinigung anderer Phagenpartikel stören können. Auch stellt die Deletion des kompletten Phagenbereichs einen weiteren Vorteil dar, da dadurch PBSX-eigene Regulationsmechanismen keine Auswirkung mehr auf andere Phagen haben können. Insbesondere der Xre-Regulator, der als Repressor der PBSX-Induktion in *B. subtilis* fungiert, kann keinen Einfluss mehr auf die Regulation anderer Phagen nehmen (McDonnell, et al., 1994, Wood, et al., 1990).

In *B. licheniformis* H1 sollte ebenfalls das plasmidbasierte Deletionssystem getestet werden (siehe 3.2.2). Hierfür wurde das Gen Bh02419 ausgewählt. Es wurde mit Hilfe des Vektors pMAD eine ca. 500 bp große Deletion im Bereich des Gens Bh02419 im Genom eingefügt. Während *B. licheniformis* DSM13 bei Wachstum auf Glukose einen Blau-Weiß-Test möglich machte, war dies für *B. licheniformis* H1 nicht möglich.

Die Deletion des PBSX-orthologen Phagens war ein erster Schritt in der Optimierung von *B. licheniformis* DSM13. Auch die verbliebenen Phagenbereiche in *B. licheniformis* DSM13 stellen potentielle Ziele für eine Deletion dar. Weitere potentielle Deletionsziele sind Gene der Flagellenbildung, der Sporulation und Gene, die für Fermentationsprozesse nicht benötigt werden. Letztlich sollen Deletionen

zur Genomreduktion, die in *B. licheniformis* DSM13 durchgeführt wurden, auch auf *B. licheniformis* H1 übertragen werden.

4.2.2. Markerfreie Insertion in *B. licheniformis*

Neben dem Einsatz von Methoden zur Deletion von Genen und ganzen Genombereichen besitzen Methoden zur Insertion einen hohen Stellenwert in der Stammoptimierung. Durch die Modifikation können Stämme an Fermentationsprozesse besser angepasst werden. Die in dieser Arbeit vorgestellte Prozedur ermöglicht nicht nur die Insertion von einzelnen Genen, sondern auch von kompletten Genclustern. Für die Erzeugung einer Insertion wurde der Urease-Gencluster aus *B. licheniformis* 9945A ausgewählt (siehe 3.4.8). Insbesondere seine genetische Organisation machten ihn in besonderem Maße geeignet, da sowohl der Transkriptionsstartpunkt des potentiellen Harnstofftransporters als auch des Urease-Operons innerhalb dieses Genclusters liegen (siehe Abb. 3.22). Als Insertionsvektor wurde pKVM2 ausgewählt, da dieses Plasmid die geringste Größe der pKVM-Vektoren besitzt (siehe Abb. 3.3). Für die Erzeugung der Insertion wurde eine kombinierte Strategie aus SOE-PCR und Hybridisierung gewählt (siehe 3.3). Für diese Strategie hat sich gezeigt, dass sie für die Erzeugung eines Vektors in dieser Größenordnung geeignet ist. Vor allem der Verzicht auf Restriktionsenzyme bietet einen entscheidenden Vorteil gegenüber Klonierung durch Restriktion und Ligation. Der Gencluster für die Harnstoffverwertung aus *B. licheniformis* 9945A sollte in *B. licheniformis* MW3 stromabwärts des Arginase Gens inseriert werden (siehe Abb. 3.16). Dadurch sollte ein Cluster generiert werden, der den Abbau von Arginin mit der Umsetzung von Harnstoff in *B. licheniformis* MW3 koppelt. Die Erzeugung folgte einem ähnlichen Schema wie die Einführung von Deletionen in das Genom von *B. licheniformis*. Bei der anschließenden Suche nach der entsprechenden Insertionsmutante musste festgestellt werden, dass eine Insertion zwar durchgeführt werden konnte, diese aber eine Instabilität aufwies. Insbesondere die Southernblot-Analyse offenbarte neben einem erwarteten Insertionsfragment zwischen der 6 kbp und 8 kbp-Bande des Längenstandards auch eine kleinere zusätzliche Bande (siehe Abb. 3.17). Diese Bande hatte eine Größe von 5 kbp und lag deutlich über der 4,2 kbp-Bande des Wildtyps. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Insertion zwar erfolgreich war, aber eine Instabilität besitzt. Eine Mischkultur aus *B. licheniformis*

MW3.2 und *B. licheniformis* MW3 kann ausgeschlossen werden, da die zweite Bande nicht der Bandes des Ausgangsstammes entsprach.

Physiologische Tests haben gezeigt, dass die Mutante *B. licheniformis* MW3.2 nicht die Fähigkeit besitzt auf Harnstoff als Stickstoffquelle zu wachsen (siehe Abb. 3.18). *B. licheniformis* 9945A, der als Donor für den Urease-Gencluster diente, besitzt diese Fähigkeit. Trotz der Instabilität der Insertion hätte eine Selektion möglich sein sollen. Da dies aber nicht der Fall war, müssen hierfür noch andere Faktoren eine Rolle spielen. Wray, et al., 1997 und Brandenburg, et al., 2002 haben gezeigt, dass eine Vielzahl an regulatorischen Faktoren die Expression des *ureABC*-Operons in *B. subtilis* regulieren. Dazu gehören die regulatorischen Elemente CodY, GlnR, TnrA, SigH und PucR. In Tab. 4.1 ist eine Auflistung der erwähnten Regulatoren und ihr Vorkommen in *B. subtilis* 168, *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* 9945A dargestellt.

Tab. 4.1: Regulatoren involviert in die Expression des Urease-Genclusters in *B. subtilis* 168 und ihr Vorkommen in *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* 9945A: x zeigt das Vorkommen des entsprechenden Regulators an.

Stamm	Regulatorische Elemente				
	CodY	GlnR	TnrA	SigH	PucR
<i>B. licheniformis</i> 9945A	X	x	x	x	x
<i>B. licheniformis</i> DSM13	X	x	x	x	x
<i>B. subtilis</i> 168	X	x	x	x	x

Alle Regulatoren aus *B. subtilis* 168, die in diesem Organismus eine Rolle in der Regulation des Urease-Genclusters spielen, sind ebenfalls in *B. licheniformis* 9945A und *B. licheniformis* DSM13 vorhanden (siehe Tab. 4.1). Die Untersuchung der Sequenz des Promotorbereiches des *ureABCDEFG*-Genclusters offenbarte lediglich ein mögliches Bindestellenmotiv für den TnrA- und GlnR-Regulator (siehe Abb. 4.2). Beide Regulatoren nutzen das gleiche Bindemotiv (5'-TGTNAN₇TNACA-3') (Brandenburg, et al., 2002).

```

aacaccgcc tcgcttaata aatgatgttt gttttttcgc ataatgaata ttctccttcc ttttcaaggt tatatatcct
tttgtggcgg agcgaattat ttactacaaa caaaaaagcg tattacttat aagaggaag aaaagttcca atatatagaa
<.....putative urea transporter .....<<
  F V A E S L L H H K N K R M

                                TnrA/GlnR-Bindemotif
cagtgtatca tatataaatt ttggaatata taaattgaca tatatgtaaa aaatgatata catttaaac agaagcaggg
gtcacatagt atatatttaa aaacttatat atttaactgt atataacattt tttactatat gtaaattttg tottcgtccc

gaatcaaata tattttcagt tttttagttt ttgcgctttc agctcagaat gttaatgaac tggctcccc ttatatgaat
cttagtttat ataaaagtca aaaaatcaaa aacgcgaaag tcgagtccta caattacttg accgaggggg aatatactta

gctcaccgtt tggtcgtaat aaaaatacag ggaggttttg tgatgcaact attaccgct gaagtagaca agcttatgat
cgagtggcaa accagcatta tttttatgtc cctccaaaac actacgttga taatggcgca cttcatctgt tcgaatacta
>>.....ureA .....>
  M Q L L P R E V D K L M

```

Abb. 4.2: Sequenz des *ureA*-Promotorbereiches: gekennzeichnet ist das TnrA/GlnR-Bindemotiv (Rot); die Gene für einen möglichen Harnstofftransporter und *ureA* begrenzen diesen Bereich; für beide Gene ist die Nukleotid- und AS-Sequenz dargestellt (Grün).

In Abb. 4.2 ist das mögliche TnrA-/GlnR-Bindemotiv dargestellt. Dieses weicht in *B. licheniformis* 9945A durch ein zusätzliches Nukleotid von dem aus *B. subtilis* 168 ermittelten Motiv ab. Weitere Bindemotive konnten nicht identifiziert werden. Eine Erklärung für den fehlenden Phänotyp könnte eine Inkompatibilität der Urease-Regulation aus *B. licheniformis* 9945A mit der aus *B. licheniformis* DSM13 sein.

4.3. Analyse des Genoms von *B. licheniformis* 9945A

Alcaraz, et al., 2010 teilten den Genus *Bacillus* in vier Gruppen ein. Dazu gehörten die Gruppen *B. clausii-halodurans*, *B. subtilis-licheniformis-pumilus*, *B. anthracis-thuringiensis-cereus* und eine neue Gruppe bestehend aus *Bacillus* sp. NRRLB-14911-coahuilensis-m3-13. *B. licheniformis* 9945A wird ebenso wie *B. licheniformis* DSM13 der *B. subtilis-licheniformis-pumilus* Gruppe zugeordnet.

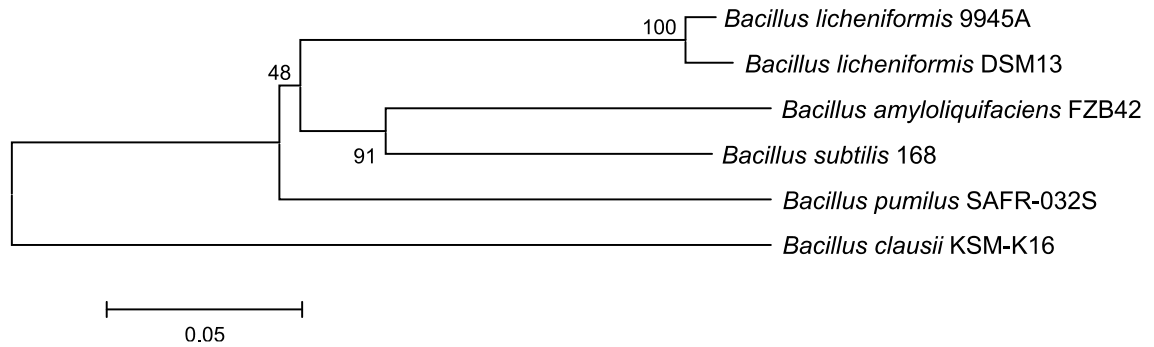


Abb. 4.3: Phylogenetische Beziehung von *dnaA* verschiedener *Bacillus*-Stämme auf Basis ihrer Nukleotid-Sequenz: hierfür wurde die Neighbor-Joining Methode angewendet; die Gesamtlänge des Baumes beträgt 0.71808116; der Prozentsatz der Replika-Bäume, in dem die assoziierten Taxa im "Bootstrap"-Test (500 Replikate) geclustert sind, befinden neben den Verzweigungen; die evolutionären Distanzen wurden mit Hilfe der "Maximum Composite Likelihood"-Methode berechnet und sind in der Einheit der Anzahl Basensubstitutionen pro Anzahl der Positionen dargestellt; das Sequenzalignment erfolgte mit Hilfe des ClustalW-Algorithmus; die phylogenetische Analyse wurde mit MEGA4 durchgeführt.

Eine phylogenetische Untersuchung auf Basis von *dnaA* zeigte eine enge verwandtschaftliche Beziehung der beiden *B. licheniformis* Stämme DSM13 und 9945A zueinander (siehe Abb. 4.3). Der phylogenetische Abstand dieser beiden Stämme zu *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquifaciens* FZB42 auf Basis dieses Taxons ist deutlich größer als zwischen beiden *B. licheniformis* Stämmen untereinander. *B. pumilus* SAFR-032S grenzt sich deutlich von den anderen Stämmen innerhalb der *B. subtilis-licheniformis-pumilus*-Gruppe ab (siehe Abb. 4.3).

Ein Genomvergleich offenbarte einen hohen Grad der Konservierung innerhalb der *B. subtilis-licheniformis-pumilus*-Gruppe (siehe 3.4.4). *B. licheniformis* 9945A besitzt zu *B. licheniformis* DSM13 eine hohe Übereinstimmung in Bezug auf Anzahl der rRNA-Cluster und tRNAs. Durch BiBaG-Analysen konnte festgestellt werden, dass 86 % der Gene im Genom von *B. licheniformis* 9945A Orthologe in *B. licheniformis* DSM13 besitzen (siehe Tab. 3.3). Aufgrund dieser Information kann man auf einen hohen Verwandtschaftsgrad zwischen beiden schließen.

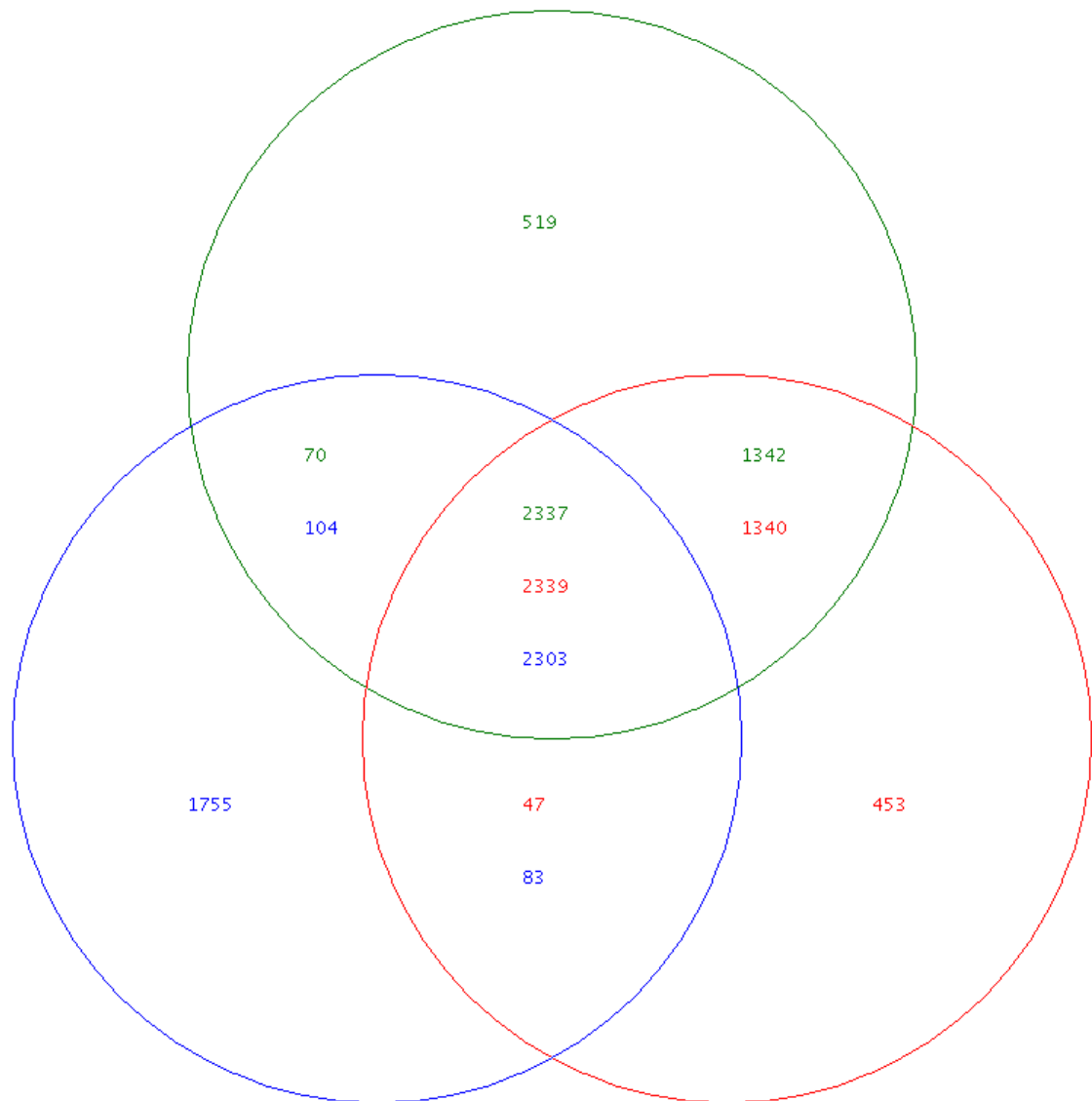


Abb. 4.4: Triple-BiBaG-Analyse der Genome der Organismen *B. licheniformis* 9945A (grün), *B. licheniformis* DSM13 (rot) und *B. subtilis* 168 (blau): dargestellt sind die Gene, die nur in einem, zwei und in drei Organismen vorkommen; die Anzahl der gemeinsamen Gene wurde durch einzelne BiBaG-Analysen bestimmt, die jeweils ausgehend von einem Organismus gegen die anderen beiden durchgeführt wurden; gewertet wurden lediglich Identitäten größer 75 % auf Basis eines globalen Alignments nach Needle-Mann-Wunsch.

Eine Triple-BiBaG-Analyse bestätigte den engen Verwandtschaftsgrad der beiden *B. licheniformis* Stämme (siehe Abb. 4.4). Lediglich 519 Gene besitzt *B. licheniformis* 9945A die *B. licheniformis* DSM13 und *B. subtilis* 168 nicht besitzen. Beide *B. licheniformis* Stämme besitzen 3679 gemeinsame Gene, dagegen sind es lediglich 2407 Gene, die sowohl in *B. licheniformis* 9945A als auch in *B. subtilis* 168 vorkommen. *B. subtilis* 168 weist mit 1755 Genen die größte Anzahl

an Genen auf, die nur in diesem Organismus und nicht in den anderen beiden Organismen auftreten. Betrachtet man die beiden *B. licheniformis*-Stämme untereinander, stellt man fest, dass *B. licheniformis* 9945A mit 589 Genen deutlich mehr Unterschiede zu *B. licheniformis* DSM13 aufweist, als *B. licheniformis* DSM13 zu *B. licheniformis* 9945A (500 Gene).

4.3.1. Allgemeine Eigenschaften des Genoms

B. licheniformis 9945A besitzt ein Chromosom, dessen Größe über der anderer Vertreter der *B. subtilis-licheniformis-pumilus*-Gruppe liegt (siehe Tab. 3.2). Dieser Unterschied beruht zum Großteil auf 589 zusätzlichen Genen, die keine Orthologe in *B. licheniformis* DSM13 besitzen (siehe Tab. 3.3 und Abb. 4.4). Aufgrund der Tatsache, dass *B. licheniformis* 9945A als natürlich-kompetenter Stamm beschrieben wurde (Gwinn and Thorne, 1964), ist es nicht verwunderlich, dass dieser Stamm empfänglich für die Integration von exogener DNA ist. *B. licheniformis* 9945A besitzt auf Genomebene alle Gene zur Ausprägung der natürlichen Kompetenz (Antje Wollherr, persönliche Kommunikation). Für eine Restauration der natürlichen Kompetenz in *B. licheniformis* DSM13 besitzt *B. licheniformis* 9945A die Voraussetzungen, um als Quelle für den Gentransfer genutzt werden zu können.

Die RM-System-Barriere in diesem Stamm fällt deutlich niedriger aus als in *B. licheniformis* H1, der durch seine RM-systeme die DNA-Aufnahme verhindert (siehe 3.1.3). Durch Konjugationsexperimente ohne zusätzliche Methylierung konnte gezeigt werden, dass eine Barriere zwar vorhanden war, aber den Plasmid-Transfer nicht gänzlich verhinderte (siehe Tab. 3.1). Diese Ergebnisse stützen die These, dass *B. licheniformis* 9945A deutlich bessere Voraussetzungen für die DNA-Aufnahme besitzt. Für sein größeres Chromosom im Vergleich zu *B. licheniformis* DSM13 könnte dies eine Erklärung sein (siehe Tab. 3.2). Durch BiBaG Analysen konnte gezeigt werden, dass sich Unterschiede zwischen *B. licheniformis* 9945A und drei engverwandten Organismen (*B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42) auf bestimmte Positionen im Genom konzentrieren (siehe Abb. 3.19). Eine Untersuchung in *Salmonella enterica* zeigte, dass in diesem Organismus ein 23 bp-Bereich die Integration exogener und Phagen-DNA auf einen Integrationshotspot konzentriert (Balbontín, et al., 2008). *B. licheniformis* 9945A besitzt ähnliche Integrationsorte, in denen vermehrt die Integration exogener und auch von Phagen-DNA erfolgte. Einer dieser Bereiche

befindet sich vermutlich zwischen den Positionen 2,8 Mbp bis 2,9 Mbp im Chromosom von *B. licheniformis* 9945A. In diesem Bereich befinden sich die Gene der Nitrat-Reduktase 2, die durch "Island Viewer" als Fremdgene identifiziert wurden (siehe 3.4.4). Im Gegensatz zu *B. licheniformis* DSM13, der vier potentielle Prophagen besitzt, konnten im Genom von *B. licheniformis* 9945A nur zwei potentielle Prophagen identifiziert werden. Der PBSX-orthologe Phage konnte in *B. licheniformis* 9945A sowohl auf genomischer als auch auf physiologischer Ebene identifiziert werden. Mitomycin C-Induktionsversuche mit *B. licheniformis* 9945A lieferten eine Abnahme in der optischen Dichte nach Induktion (Daten nicht aufgeführt). Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen offenbarten Phagenpartikel, die in ihrem Aufbau dem PBSX-Prophagen aus *B. subtilis* 168 und *B. licheniformis* DSM13 entsprachen.

4.3.2. Physiologische Eigenschaften

Fremdgene vermitteln zum Teil zusätzliche Eigenschaften, die *B. licheniformis* DSM13 nicht besitzt. Ein Beispiel hierfür ist der Gencluster für die Verwertung von Harnstoff (*ureABCEFGDH*) (siehe Abb. 3.22). Betrachtet man sein Vorkommen in anderen Bacillen, insbesondere in *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42, stellt man fest, dass lediglich *B. subtilis* 168 orthologe Gene dazu aufweist. Es handelt sich dabei um die strukturellen Gene *ureABC* (Kim, et al., 2005). *B. subtilis* 168 besitzt keine Gene, die mit diesem Operon assoziiert sind und für akzesorische Proteine kodieren. Diese Beobachtungen legten nahe, dass der Ureaseabbau eine evolutionär junge Fähigkeit in *B. licheniformis* 9945A ist. Physiologische Untersuchungen zeigten, dass *B. licheniformis* 9945A auf Harnstoff als einziger Stickstoffquelle wachsen kann (siehe Abb. 3.18). Eine Übertragung des Urea-Abbaucusters auf *B. licheniformis* MW3 führte nicht zur Ausprägung eines Phänotyps (siehe 3.3 und 4.2.2.).

B. licheniformis 9945 besitzt Gene, die Ähnlichkeiten zu Xylan-depolymerisierenden Enzymen haben. Die Produkte der Gene *xynABCD* aus *B. subtilis* 168 vermitteln eine Depolymerisation von Xylanderivaten (Bourgois, et al., 2007, St John, et al., 2006). Orthologe Gene dazu konnten ebenfalls in *B. licheniformis* 9945A identifiziert werden (siehe 3.4.9). *B. licheniformis* DSM13 weist diese Gene mit Ausnahme einer möglichen beta-1,4-Xylosidase nicht auf (Rey, et al., 2004, Veith, et al., 2004). Untersuchungen auf Basis der Genomorganisation dieser Gene

zeigten, dass die Gene *xynABCD* in *B. licheniformis* 9945A und *B. subtilis* 168 keine konservierte Genorganisation aufweisen. Da *B. licheniformis* DSM13 diese Gene nicht besitzt und in *B. subtilis* sie in einem anderen genomischen Kontext auftreten (siehe Abb. A1), liegt die Vermutung nahe, dass die Gene *xynABCD* durch horizontalen Gentransfer erworben wurden.

4.3.3. Anaerobes Wachstum

Für *B. licheniformis* konnte gezeigt werden, dass dieser Organismus anaerob wachsen kann (Bulthuis, et al., 1991, Clements, et al., 2002). In *B. licheniformis* 9945A konnte ebenso wie in *B. licheniformis* DSM13 eine Ribonukleotid-Reduktase der Klasse III identifiziert werden. Ribonukleotid-Reduktasen werden in drei Klassen unterteilt, wobei Ribonukleotid-Reduktasen der Klasse III sauerstoffsensitiv sind und ihr Auftreten auf anaerobes Wachstum hindeutet. Darüber hinaus konnten Gene entdeckt werden, die für die Nutzung von Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette benötigt werden. Es handelt sich um Gene, die für zwei Nitrat-Reduktasen kodieren. Nitrat-Reduktase 2 wurde als Fremdgen identifiziert und vermutlich durch horizontalen Gentransfer erworben (siehe 3.4.4). In *B. licheniformis* DSM13 konnte mittels "Microarray"-Analysen nachgewiesen werden, dass unter anaeroben Bedingungen die Gene der Nitrat-Reduktase stets exprimiert werden (Schwarzer, 2010). Da *B. licheniformis* 9945A zwei Nitrat-Reduktasen besitzt, wäre es interessant zu sehen, ob Nitrat-Reduktase 2 in *B. licheniformis* 9945A eine ähnliche Funktion unter anaerobem Wachstum einnimmt. RT-PCRs könnten darüber Aufschluss geben. Obwohl in der Literatur *B. licheniformis* als Denitrifizierer beschrieben wurde (Pichinoty, et al., 1978), konnten weder in *B. licheniformis* DSM13 noch in *B. licheniformis* 9945A Gene für eine vollständige Denitrifikation entdeckt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Denitrifizierung vermutlich keine allgemeine Eigenschaft dieser Spezies ist. Um dies weiter zu erhärten, wäre eine genomische Analyse dieser Gene in bekannten Denitrifizierern dieser Spezies notwendig.

4.3.4. Antibiotika und sekundäre Metabolite

B. licheniformis 9945A besitzt drei NRPS-Gen-Cluster und einen für die Biosynthese von Lantibiotika. *B. licheniformis* DSM13 weist von diesen lediglich einen NRPS-Gencluster und einen Biosynthese-Cluster für Lantibiotika auf. Gene, die in Zu-

sammenhang mit Lantibiotika stehen, konnten innerhalb eines Genclusters identifiziert werden (siehe Abb. 3.24). Da zwei Vorläuferpeptide für die Biosynthese von Lantibiotika vorliegen, kann bei einer Expression dieses Genclusters davon ausgegangen werden, dass mindestens zwei Peptid-Lantibiotika synthetisiert werden. In *B. licheniformis* DSM13 konnten ebenfalls zwei Vorläuferpeptide identifiziert werden, die zusammen das Antibiotikum Lichenicidin bilden (Dischinger, et al., 2009). Die Identitäten zu den Vorläuferpeptiden LicA1 und LicA2 liegen unter 50 %, was auf einen deutlichen Unterschied der Lantibiotika beider Organismen schließen lässt.

Nicht ribosomal synthetisierte Peptide (NRP) können zyklische Peptid-Grundgerüste enthalten und sind als Antibiotika, Immunsuppressiva und Anti-Tumor-Reagenzien von großem pharmazeutischen Interesse (Schwarzer and Marahiel, 2001). NRP-Synthetasen setzen sich modulartig aus repetitiven katalytischen Einheiten zusammen, die innerhalb einer CDS oder auf mehrere Gene verteilt vorliegen können (Guenzi, et al., 1998). Neben antimikrobieller Wirkung dieser Lipopeptide spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Interaktion von *Bacillus* Spezies mit Pflanzen (Ongena and Jacques, 2008). Sie stimulieren Abwehrmechanismen des Wirtes und können so zu einer induzierten systemischen Resistenz beitragen (Jourdan, et al., 2009, Ongena, et al., 2007). Da *B. licheniformis* im Boden sein natürliches Vorkommen besitzt und insgesamt drei NRPS-Gencluster besitzt, liegt auch eine mögliche Bakterium-Pflanzen-Interaktion für *B. licheniformis* 9945A nahe.

Der Lichenysin-Gencluster zeigt eine hohe Homologie zu dem Lichenysin- und Surfactin-Gencluster aus *B. licheniformis* DSM13 und *B. subtilis* 168. Lichenysin stellt eine Isoform des Surfactin dar. Surfactin ist der bisher oberflächenaktivste bekannte Stoff biologischen Ursprungs (Raaijmakers, et al., 2010). Dieser NRPS-Gencluster ist innerhalb der Spezies *B. licheniformis* und seiner nächsten Verwandten stark konserviert, was auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung schließen lässt.

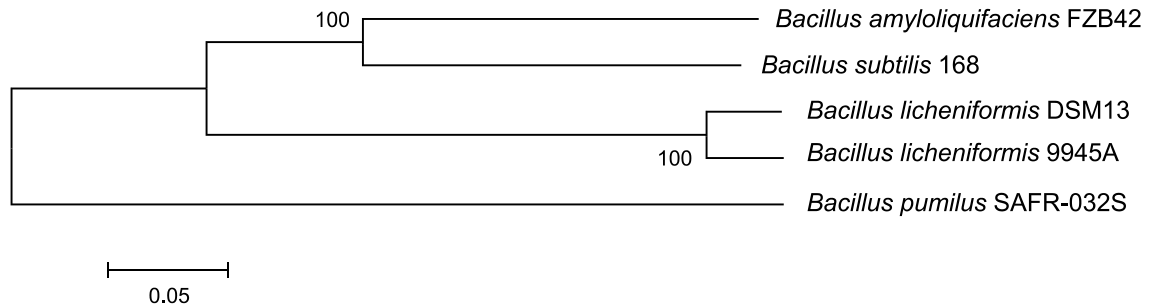


Abb. 4.5: Phylogenetische Beziehung von Lichenysin/Surfactin-Synthetase B verschiedener *Bacillus*-Stämme auf Basis ihrer Nukleotid-Sequenz: hierfür wurde die Neighbor-Joining Methode angewendet; die Gesamtlänge des Baumes beträgt 1.06613477; der Prozentsatz der Replika-Bäume, in dem die assoziierten Taxa im "Bootstrap"-Test (500 Replikate) geclustert sind, befinden neben den Verzweigungen; die evolutionären Distanzen wurden mit Hilfe der "Maximum Composite Likelihood"-Methode berechnet und sind in der Einheit der Anzahl Basensubstitutionen pro Anzahl der Position dargestellt; das Sequenzalignment erfolgte mit Hilfe des ClustalW-Algorithmus; die phylogenetische Analyse wurde mit MEGA4 durchgeführt.

Ein phylogenetischer Vergleich der Lichenysin/Surfactin-Synthetase B der Vertreter der *B. subtilis-licheniformis-pumilus*-Gruppe zeigte ebenfalls eine enge Verwandtschaftsbeziehung der beiden *B. licheniformis* Stämme zueinander (siehe Abb. 4.5). Dies konnte bereits durch eine phylogenetische Untersuchung von *dnaA* innerhalb dieser Gruppe gezeigt werden (siehe Abb. 4.3). Lediglich der Abstand der beiden *B. licheniformis* Stämme zu *B. amyloliquifaciens* FZB42 unterscheidet beide phylogenetischen Untersuchungen voneinander. Auf Basis von *dnaA* liegt eine engere phylogenetische Beziehung von *B. licheniformis* mit *B. subtilis* 168 vor, während für Lichenysin/Surfactin-Synthetase B eine Nähe zu *B. amyloliquifaciens* FZB42 beobachtet werden konnte (siehe Abb. 4.3 und Abb. 4.5). Andere Vertreter der Gattung *Bacillus* konnten nicht in die Untersuchung mit aufgenommen werden, da das Auftreten des Lichenysin/Surfactin-Synthetase-Clusters auf die *B. subtilis-licheniformis-pumilus*-Gruppe beschränkt ist.

Ein weiterer Gencluster kodiert für NRP-Synthetasen, die die Biosynthese von Bacitracin katalysieren (siehe 3.4.11). Ishihara, et al., 2002 untersuchten 22 *B. licheniformis* Stämme auf Vorkommen von Bacitracin-Synthetasen durch DNA-DNA-Hybridisierung. Sie konnten elf Stämme identifizieren, die ein Bacitracin-positives Signal lieferten. Alle elf Stämme wiesen darüber hinaus eine Erythromycin-Resistenz auf, während alle Bacitracin-negativen Stämme mit einer Ausnahme diese Resistenz nicht besaßen. Ishihara, et al., 2002 teilten daraufhin

die Spezies *B. licheniformis* in zwei Gruppen ein, eine Bacitracin-positive/Erythromycin-resistente und eine Bacitracin-negative/ Erythromycin-sensitive Gruppe. *B. licheniformis* 9945A gehört aufgrund der Gene für die Bacitracin-Biosynthese und die Ausprägung einer Erythromycin-Resistenz zur ersten Gruppe (siehe 3.4.11). Für eine bessere genetische Handhabbarkeit sollte in einem der ersten Schritte die Resistenz gegenüber Erythromycin entfernt werden. Der dritte NRPS-Gencluster (BaLi_c22150 - BaLi_c22190) besitzt Homologien zum Fengycin-Gencluster aus *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Chen, et al., 2007, Chen, et al., 2009). Im Aufbau der Module unterscheidet sich dieser NRPS-Cluster nicht von der Abfolge des Fengycin-Gencluster aus *B. amyloliquefaciens* FZB42. Die Gene der Fengycin-Biosynthese aus *B. amyloliquefaciens* FZB42 besitzen Identitäten zwischen 60 % –65 % zu Piliplastatin-Synthetasen aus *B. subtilis* 168 (Chen, et al., 2007). Ein Vergleich zwischen Fengycin und Piliplastatin offenbarte lediglich einen Unterschied in der Stöchiometrie einer AS (Volpon, et al., 2000). Die Aminosäure Tyrosin liegt dabei anstatt in der D-Form in der L-Form vor. Für das Syntheseprodukt der NRP-Synthetasen des dritten NRPS-Genclusters wird daher ein sehr ähnlicher Aufbau vermutet. Fengycin ist besonders gegen filamentöse Pilze aktiv (Vanittanakom, et al., 1986).

4.3.5. Ausblick

B. licheniformis 9945A stellt einen Organismus dar, der in Bezug auf seine Physiologie zusätzliche Eigenschaften besitzt. Neben den Genen für Xylanabbau und Harnstoffverwertung besitzt er zwei zusätzliche NRPS-Gencluster die *B. licheniformis* DSM13 nicht aufweist. Besonders seine einfache genetische Zugänglichkeit machen ihn zu einem interessanten Untersuchungsobjekt innerhalb der Spezies *B. licheniformis*. *B. licheniformis* 9945A kann sowohl durch Konjugation (siehe Tab. 3.1) als auch durch natürliche Kompetenz transformiert werden (Gwinn and Thorne, 1964). Obwohl dieser Stamm ein ca. 150 kbp größeres Chromosom als *B. licheniformis* DSM13 aufweist, besitzt *B. licheniformis* 9945A eine geringere Anzahl an Phagenregionen. Für die Stammoptimierung würde sich dieser Stamm besonders eignen, da neben der geringeren Anzahl an Prophagen auch seine natürliche Kompetenz ein großer Vorteil wäre. Weiterhin könnten auch Methoden zur Einführung von markerfreien Deletionen, wie sie beispielsweise Yu, et al., 2010 vorgestellt haben, verwendet werden. Darüber hinaus kann dieser Stamm

auch als genetische Quelle für die Optimierung anderer *B. licheniformis* Stämme genutzt werden. Insbesondere für die Restauration der natürlichen Kompetenz in *B. licheniformis* DSM13 kann auf Gene aus diesem Organismus zurückgegriffen werden.

5. Zusammenfassung

- In dieser Arbeit konnte ein Protokoll zur Elektroporation von *B. licheniformis* MW3 entwickelt werden. Zellen in der frühen exponentiellen Phase lieferten elektrokompetente Zellen, mit denen Elektroporationseffizienzen bis zu 280 Transformanten/ μg DNA erreicht werden konnten.
- Mit dem pKVM-System konnten konjugative Vektoren für die markerfreie Mutagenese erstellt werden. Die Vektoren basierend auf Komponenten aus den Vektoren pKV12 und pMAD konnten auf verschiedene *B. subtilis* und *B. licheniformis* Stämme durch Konjugation übertragen werden.
- Für die Transformation von *B. licheniformis* H1 wurde basierend auf den stammeigenen DNA-Methyltransferasen ein *in vivo*-Methylierungssystem entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass neben den beiden TypII-RM-Systemen auch ein methylierungsabhängiges TypIV-RM-System aktiv ist.
- Durch Entfernung des PBSX-orthologen Phagen in *B. licheniformis* MW3 wurde eine 31 kbp Deletion erzeugt. Der daraus resultierende Stamm zeigte im Gegensatz zum Ausgangsstamm in Flüssigkultur keine Abnahme der optischen Dichte nach Zugabe von Mitomycin C. Die Deletion des PBSX-orthologen Phagen stellte eine erste Deletion auf dem Weg zu einem *B. licheniformis* Optimalgenom dar.
- Neben *B. licheniformis* MW3 wurde auch für *B. licheniformis* H1 gezeigt werden, dass eine markerfreie Deletion mit Hilfe des pMAD-Vektorsystems möglich war.
- In dieser Arbeit konnte ebenfalls ein Insertionssystem für *B. licheniformis* MW3 etabliert werden. Durch Kombination von SOE-PCR und Hybridisierung war die Konstruktion eines 17,7 kbp Insertionsvektors möglich. Dieser konnte durch Konjugation auf *B. licheniformis* MW3 übertragen werden. Für die Insertion wurde der Urease-Gencluster mit einem assoziierten potentiellen Harnstofftransporter aus *B. licheniformis* 9945A ausgewählt. Southern-

Analysen offenbarten eine Instabilität der Insertion. Auch ein Phänotyp konnte nicht detektiert werden.

- Das Genom von *B. licheniformis* 9945A wurde vollständig sequenziert und besteht aus einem Chromosom mit einer Größe von 4.376.307 bp. *B. licheniformis* besitzt in seiner Genausstattung hohe Ähnlichkeit zu *B. licheniformis* DSM13. 86 % der Gene aus *B. licheniformis* 9945A sind auch in *B. licheniformis* DSM13 zu finden, während 14 % der Gene keine Orthologen in *B. licheniformis* DSM13 besitzen.
- Ein Genomvergleich der Stämme *B. licheniformis* 9945A und *B. licheniformis* DSM13 zeigte Unterschiede in der Phageausstattung, der NRP-Synthese, der Stickstoffassimilation und dem anaeroben Wachstum auf.

6. Literaturverzeichnis

- Alcaraz, LD, G Moreno-Hagelsieb, LE Eguiarte, V Souza, L Herrera-Estrella, and G Olmedo-Alvarez. 'Understanding the Evolutionary Relationships and Major Traits of *Bacillus* through Comparative Genomics.', *BMC Genomics* Vol. 11, No. 1, 332, 2010.
- Anagnostopoulos, C, and J Spizizen. 'Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*.' *J Bacteriol* Vol. 81, No. 5, 741-6, 1961.
- Anderson, LM, and KF Bott. 'DNA Packaging by the *Bacillus subtilis* Defective Bacteriophage PBSX.' *J Virol* Vol. 54, No. 3, 773-80, 1985.
- Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille. 'New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria', *Appl Environ Microbiol* Vol. 70, No. 11, 6887-91, 2004.
- Badger, JH, and GJ Olsen. 'Critica: Coding Region Identification Tool Invoking Comparative Analysis.' *Mol Biol Evol* Vol. 16, No. 4, 512-24, 1999.
- Balbontín, R, N Figueroa-Bossi, J Casadesús, and L Bossi. 'Insertion Hot Spot for Horizontally Acquired DNA within a Bidirectional Small-RNA Locus in *Salmonella enterica*.' *J Bacteriol* Vol. 190, No. 11, 4075-8, 2008.
- Barbe, V, S Cruveiller, F Kunst, P Lenoble, G Meurice, A Sekowska, D Vallenet, T Wang, I Moszer, C Médigue, and A Danchin. 'From a Consortium Sequence to a Unified Sequence: The *Bacillus subtilis* 168 Reference Genome a Decade Later.' *Microbiology* Vol. 155, No. Pt 6, 1758-75, 2009.
- Bertram, J, M Strätz, and P Dürre. 'Natural Transfer of Conjugative Transposon Tn916 between Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.' *J Bacteriol* Vol. 173, No. 2, 443-8, 1991.
- Bourgois, TM, V Van Craeyveld, S Van Campenhout, CM Courtin, JA Delcour, J Robben, and G Volckaert. 'Recombinant Expression and Characterization of

- XynD from *Bacillus subtilis subsp. subtilis* ATCC 6051: A GH 43 Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase.', *Appl Microbiol Biotechnol* Vol. 75, No. 6, 1309-17, 2007.
- Brandenburg, JL, LV Jr Wray, L Beier, H Jarmer, HH Saxild, and SH Fisher. 'Roles of PucR, GlnR, and TnrA in Regulating Expression of the *Bacillus subtilis* Ure P3 Promoter.', *J Bacteriol* Vol. 184, No. 21, 6060-4, 2002.
- Brans, A, P Filée, A Chevigné, A Claessens, and B Joris. 'New Integrative Method to Generate *Bacillus subtilis* Recombinant Strains Free of Selection Markers.', *Appl Environ Microbiol* Vol. 70, No. 12, 7241-50, 2004.
- Bulthuis, BA, C Rommens, GM Koningstein, AH Stouthamer, and HW van Verseveld. 'Formation of Fermentation Products and Extracellular Protease During Anaerobic Growth of *Bacillus licheniformis* in Chemostat and Batch-Culture.', *Antonie Van Leeuwenhoek* Vol. 60, No. 3-4, 355-71, 1991.
- Chang, S., and S. N. Cohen. 'High-Frequency Transformation of *Bacillus subtilis* Protoplasts by Plasmid DNA', *Molecular & General Genetics* Vol. 168, No. 1, 111-115, 1979.
- Chen, Q, JR Fischer, VM Benoit, NP Dufour, P Youderian, and JM Leong. 'In Vitro CpG Methylation Increases the Transformation Efficiency of *Borrelia burgdorferi* Strains Harboring the Endogenous Linear Plasmid Lp56.', *J Bacteriol* Vol. 190, No. 24, 7885-91, 2008.
- Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, A. Eisenreich, K. Schneider, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, B. Voss, W. R. Hess, O. Reva, H. Junge, B. Voigt, P. R. Jungblut, J. Vater, R. Sussmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk, and R. Borriss. 'Comparative Analysis of the Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42', *Nat Biotechnol* Vol. 25, No. 9, 1007-14, 2007.
- Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, R. Sussmuth, J. Piel, and R. Borriss. 'Genome Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Reveals Its Potential for Biocontrol of Plant Pathogens', *J Biotechnol* Vol. 140, No. 1-2, 27-37, 2009.

- Cheng, X, and RJ Roberts. 'Adomet-Dependent Methylation, DNA Methyltransferases and Base Flipping.', *Nucleic Acids Res* Vol. 29, No. 18, 3784-95, 2001.
- Chester, N, and DR Marshak. 'Dimethyl Sulfoxide-Mediated Primer T_m Reduction: A Method for Analyzing the Role of Renaturation Temperature in the Polymerase Chain Reaction.', *Anal Biochem* Vol. 209, No. 2, 284-90, 1993.
- Chopra, I, and M Roberts. 'Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance.', *Microbiol Mol Biol Rev* Vol. 65, No. 2, 232-60 ; second page, table of contents, 2001.
- Clements, LD, BS Miller, and UN Streips. 'Comparative Growth Analysis of the Facultative Anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*.' , *Syst Appl Microbiol* Vol. 25, No. 2, 284-6, 2002.
- Clokie, Martha R.J., and Andrew M. Kropinsk. 'Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions', Springer Protocols, 2008.
- Connell, SR, DM Tracz, KH Nierhaus, and DE Taylor. 'Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance.', *Antimicrob Agents Chemother* Vol. 47, No. 12, 3675-81, 2003.
- Cruz-Ramos, H, P Glaser, LV Jr Wray, and SH Fisher. 'The *Bacillus subtilis* UreABC Operon.', *J Bacteriol* Vol. 179, No. 10, 3371-3, 1997.
- Delcher, AL, D Harmon, S Kasif, O White, and SL Salzberg. 'Improved Microbial Gene Identification with Glimmer.', *Nucleic Acids Res* Vol. 27, No. 23, 4636-41, 1999.
- Dischinger, J, M Josten, C Szekat, HG Sahl, and G Bierbaum. 'Production of the Novel Two-Peptide Lantibiotic Lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM13.', *PLoS One* Vol. 4, No. 8, e6788, 2009.
- Dryden, DT, NE Murray, and DN Rao. 'Nucleoside Triphosphate-Dependent Restriction Enzymes.', *Nucleic Acids Res* Vol. 29, No. 18, 3728-41, 2001.

- Dunny, GM, LN Lee, and DJ LeBlanc. 'Improved Electroporation and Cloning Vector System for Gram-Positive Bacteria.', *Appl Environ Microbiol* Vol. 57, No. 4, 1194-201, 1991.
- Fabret, C, SD Ehrlich, and P Noirot. 'A New Mutation Delivery System for Genome-Scale Approaches in *Bacillus subtilis*.' , *Mol Microbiol* Vol. 46, No. 1, 25-36, 2002.
- Feng, L, W Wang, J Cheng, Y Ren, G Zhao, C Gao, Y Tang, X Liu, W Han, X Peng, R Liu, and L Wang. 'Genome and Proteome of Long-Chain Alkane Degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 Isolated from a Deep-Subsurface Oil Reservoir.' , *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 104, No. 13, 5602-7, 2007.
- Finking, R, and MA Marahiel. 'Biosynthesis of Nonribosomal Peptides1.' , *Annu Rev Microbiol* Vol. 58, 453-88, 2004.
- Geier, GE, and P Modrich. 'Recognition Sequence of the Dam Methylase of *Escherichia coli* K12 and Mode of Cleavage of Dpn I Endonuclease.' , *J Biol Chem* Vol. 254, No. 4, 1408-13, 1979.
- Gennaro, ML, J Kornblum, and RP Novick. 'A Site-Specific Recombination Function in *Staphylococcus aureus* Plasmids.' , *J Bacteriol* Vol. 169, No. 6, 2601-10, 1987.
- Gomez-Eichelmann, MC, A Levy-Mustri, and J Ramirez-Santos. 'Presence of 5-Methylcytosine in CC(AT)GG Sequences (Dcm Methylation) in DNAs from Different Bacteria.' , *J Bacteriol* Vol. 173, No. 23, 7692-4, 1991.
- González, PJ, C Correia, I Moura, CD Brondino, and JJ Moura. 'Bacterial Nitrate Reductases: Molecular and Biological Aspects of Nitrate Reduction.' , *J Inorg Biochem* Vol. 100, No. 5-6, 1015-23, 2006.
- Gryczan, T, M Israeli-Reches, M Del Bue, and D Dubnau. 'Dna Sequence and Regulation of Ermd, a Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Element from *Bacillus licheniformis*.' , *Mol Gen Genet* Vol. 194, No. 3, 349-56, 1984.

- Gu, Y, Y Ding, C Ren, Z Sun, DA Rodionov, W Zhang, S Yang, C Yang, and W Jiang. 'Reconstruction of Xylose Utilization Pathway and Regulons in Firmicutes.', *BMC Genomics* Vol. 11, No. 1, 255, 2010.
- Guenzi, E, G Galli, I Grgurina, DC Gross, and G Grandi. 'Characterization of the Syringomycin Synthetase Gene Cluster. A Link between Prokaryotic and Eukaryotic Peptide Synthetases.', *J Biol Chem* Vol. 273, No. 49, 32857-63, 1998.
- Guo, FB, HY Ou, and CT Zhang. 'Zcurve: A New System for Recognizing Protein-Coding Genes in Bacterial and Archaeal Genomes.', *Nucleic Acids Res* Vol. 31, No. 6, 1780-9, 2003.
- Gwinn, DD, and CB Thorne. 'Transformation of *Bacillus licheniformis*.' *J Bacteriol* Vol. 87, 519-26, 1964.
- Haas, M, and H Yoshikawa. 'Defective Bacteriophage PBSH in *Bacillus subtilis*. I. Induction, Purification, and Physical Properties of the Bacteriophage and Its Deoxyribonucleic Acid.', *J Virol* Vol. 3, No. 2, 233-47, 1969.
- Hamoen, LW, G Venema, and OP Kuipers. 'Controlling Competence in *Bacillus subtilis*: Shared Use of Regulators.', *Microbiology* Vol. 149, No. Pt 1, 9-17, 2003.
- Harwood, Colin R., and Simon M. Cutting. *Molecular Biological Methods for Bacillus*, Wiley, 1990.
- Hayatsu, H., K. Negishi, M. Shiraishi, K. Tsuji, and K. Moriyama. 'Chemistry of Bisulfite Genomic Sequencing; Advances and Issues', *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, No. 51, 47-8, 2007.
- Heckman, K. L., and L. R. Pease. 'Gene Splicing and Mutagenesis by PCR-Driven Overlap Extension', *Nat Protoc* Vol. 2, No. 4, 924-32, 2007.
- Heinemann, JA, and GF Jr Sprague. 'Bacterial Conjugative Plasmids Mobilize DNA Transfer between Bacteria and Yeast.', *Nature* Vol. 340, No. 6230, 205-9, 1989.

- Hsiao, W, I Wan, SJ Jones, and FS Brinkman. 'Islandpath: Aiding Detection of Genomic Islands in Prokaryotes.', *Bioinformatics* Vol. 19, No. 3, 418-20, 2003.
- Huang, W, and J Marmur. 'Characterization of Inducible Bacteriophages in *Bacillus licheniformis*.' , *J Virol* Vol. 5, No. 2, 237-46, 1970.
- Hunter, S, R Apweiler, TK Attwood, A Bairoch, A Bateman, D Binns, P Bork, U Das, L Daugherty, L Duquenne, RD Finn, J Gough, D Haft, N Hulo, D Kahn, E Kelly, A Laugraud, I Letunic, D Lonsdale, R Lopez, M Madera, J Maslen, C McAnulla, J McDowall, J Mistry, A Mitchell, N Mulder, D Natale, C Orengo, AF Quinn, JD Selengut, CJ Sigrist, M Thimma, PD Thomas, F Valentin, D Wilson, CH Wu, and C Yeats. 'Interpro: The Integrative Protein Signature Database.' , *Nucleic Acids Res* Vol. 37, D211-5, 2009.
- Ishihara, H, M Takoh, R Nishibayashi, and A Sato. 'Distribution and Variation of Bacitracin Synthetase Gene Sequences in Laboratory Stock Strains of *Bacillus licheniformis*.' , *Curr Microbiol* Vol. 45, No. 1, 18-23, 2002.
- Itaya, M., N. Sakaya, S. Matsunaga, K. Fujita, and S. Kaneko. 'Conjugational Transfer Kinetics of pLS20 between *Bacillus subtilis* in Liquid Medium', *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* Vol. 70, No. 3, 740-742, 2006.
- Janscak, P, U Sandmeier, MD Szczelkun, and TA Bickle. 'Subunit Assembly and Mode of DNA Cleavage of the Type III Restriction Endonucleases EcoP1I and EcoP15i.' , *J Mol Biol* Vol. 306, No. 3, 417-31, 2001.
- Jennert, KC, C Tardif, DI Young, and M Young. 'Gene Transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319.' , *Microbiology* Vol. 146 Pt 12, 3071-80, 2000.
- Jones, DT, M Shirley, X Wu, and S Keis. 'Bacteriophage Infections in the Industrial Acetone Butanol (AB) Fermentation Process.' , *J Mol Microbiol Biotechnol* Vol. 2, No. 1, 21-6, 2000.
- Jourdan, E, G Henry, F Duby, J Dommès, JP Barthélemy, P Thonart, and M Ongena. 'Insights into the Defense-Related Events Occurring in Plant Cells Following Perception of Surfactin-Type Lipopeptide from *Bacillus subtilis*.' , *Mol Plant Microbe Interact* Vol. 22, No. 4, 456-68, 2009.

- Kelleher, JE, and EA Raleigh. 'A Novel Activity in Escherichia Coli K-12 That Directs Restriction of DNA Modified at CG Dinucleotides.', *J Bacteriol* Vol. 173, No. 16, 5220-3, 1991.
- Kim, J. K., S. B. Mulrooney, and R. P. Hausinger. 'Biosynthesis of Active *Bacillus subtilis* Urease in the Absence of Known Urease Accessory Proteins', *Journal of Bacteriology* Vol. 187, No. 20, 7150-7154, 2005.
- Koehler, T. M., and C. B. Thorne. '*Bacillus-Subtilis* (Natto) Plasmid pLS20 Mediates Interspecies Plasmid Transfer', *Journal of Bacteriology* Vol. 169, No. 11, 5271-5278, 1987.
- Konz, D, A Klens, K Schörgendorfer, and MA Marahiel. 'The Bacitracin Biosynthesis Operon of *Bacillus Licheniformis* ATCC 10716: Molecular Characterization of Three Multi-Modular Peptide Synthetases.', *Chem Biol* Vol. 4, No. 12, 927-37, 1997.
- Kunst, F, N Ogasawara, I Moszer, AM Albertini, G Alloni, V Azevedo, MG Bertero, P Bessières, A Bolotin, S Borchert, R Borriss, L Boursier, A Brans, M Braun, SC Brignell, S Bron, S Brouillet, CV Bruschi, B Caldwell, V Capuano, NM Carter, SK Choi, JJ Codani, IF Connerton, and A Danchin. 'The Complete Genome Sequence of the Gram-Positive Bacterium *Bacillus subtilis*.', *Nature* Vol. 390, No. 6657, 249-56, 1997.
- Langille, MG, WW Hsiao, and FS Brinkman. 'Evaluation of Genomic Island Predictors Using a Comparative Genomics Approach.', *BMC Bioinformatics* Vol. 9, 329, 2008.
- Le Breton, Y, NP Mohapatra, and WG Haldenwang. '*In Vivo* Random Mutagenesis of *Bacillus subtilis* by Use of TNYLB-1, a Mariner-Based Transposon.', *Appl Environ Microbiol* Vol. 72, No. 1, 327-33, 2006.
- Lowe, TM, and SR Eddy. 'tRNAScan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence.', *Nucleic Acids Res* Vol. 25, No. 5, 955-64, 1997.

- Lubys, A., and A. Janulaitis. 'Cloning and Analysis of the Plasmid-Borne Genes Encoding the Bsp6I Restriction and Modification Enzymes', *Gene* Vol. 157, No. 1-2, 25-9, 1995.
- Løbner-Olesen, A, O Skovgaard, and MG Marinus. 'Dam Methylation: Coordinating Cellular Processes.', *Curr Opin Microbiol* Vol. 8, No. 2, 154-60, 2005.
- Maravić, G. 'Macrolide Resistance Based on the Erm-Mediated rRNA Methylation.', *Curr Drug Targets Infect Disord* Vol. 4, No. 3, 193-202, 2004.
- Marchler-Bauer, A, JB Anderson, PF Cherukuri, C DeWeese-Scott, LY Geer, M Gwadz, S He, DI Hurwitz, JD Jackson, Z Ke, CJ Lanczycki, CA Liebert, C Liu, F Lu, GH Marchler, M Mullokandov, BA Shoemaker, V Simonyan, JS Song, PA Thiessen, RA Yamashita, JJ Yin, D Zhang, and SH Bryant. 'CDD: A Conserved Domain Database for Protein Classification.', *Nucleic Acids Res* Vol. 33, D192-6, 2005.
- Margulies, M, M Egholm, WE Altman, S Attiya, JS Bader, LA Bembien, J Berka, MS Braverman, YJ Chen, Z Chen, SB Dewell, L Du, JM Fierro, XV Gomes, BC Godwin, W He, S Helgesen, CH Ho, GP Irzyk, SC Jando, ML Alenquer, TP Jarvie, KB Jirage, JB Kim, JR Knight, JR Lanza, JH Leamon, SM Lefkowitz, M Lei, J Li, KL Lohman, H Lu, VB Makhijani, KE McDade, MP McKenna, EW Myers, E Nickerson, JR Nobile, R Plant, BP Puc, MT Ronan, GT Roth, GJ Sarkis, JF Simons, JW Simpson, M Srinivasan, KR Tartaro, A Tomasz, KA Vogt, GA Volkmer, SH Wang, Y Wang, MP Weiner, P Yu, RF Begley, and JM Rothberg. 'Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors.', *Nature* Vol. 437, No. 7057, 376-80, 2005.
- McAuliffe, O, RP Ross, and C Hill. 'Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action.', *FEMS Microbiol Rev* Vol. 25, No. 3, 285-308, 2001.
- McDonnell, GE, H Wood, KM Devine, and DJ McConnell. 'Genetic Control of Bacterial Suicide: Regulation of the Induction of PBSX in *Bacillus subtilis*.', *J Bacteriol* Vol. 176, No. 18, 5820-30, 1994.
- Mermelstein, LD, and ET Papoutsakis. '*In Vivo* Methylation in *Escherichia Coli* by the *Bacillus subtilis* Phage Phi 3t I Methyltransferase to Protect Plasmids from

- Restriction Upon Transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.', *Appl Environ Microbiol* Vol. 59, No. 4, 1077-81, 1993.
- Morimoto, T, R Kadoya, K Endo, M Tohata, K Sawada, S Liu, T Ozawa, T Kodama, H Kakeshita, Y Kageyama, K Manabe, S Kanaya, K Ara, K Ozaki, and N Ogasawara. 'Enhanced Recombinant Protein Productivity by Genome Reduction in *Bacillus subtilis*.', *DNA Res* Vol. 15, No. 2, 73-81, 2008.
- Murray, N. E. 'Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle)', *Microbiol Mol Biol Rev* Vol. 64, No. 2, 412-34, 2000.
- Nahrstedt, H., J. Waldeck, M. Grone, R. Eichstadt, J. Feesche, and F. Meinhardt. 'Strain Development in *Bacillus licheniformis*: Construction of Biologically Contained Mutants Deficient in Sporulation and DNA Repair', *Journal of Biotechnology* Vol. 119, No. 3, 245-254, 2005.
- Nijland, R, JG Burgess, J Errington, and JW Veening. 'Transformation of Environmental *Bacillus subtilis* Isolates by Transiently Inducing Genetic Competence.', *PLoS One* Vol. 5, No. 3, e9724, 2010.
- Ohsawa, T, K Tsukahara, and M Ogura. '*Bacillus Subtilis* Response Regulator DegU Is a Direct Activator of PgsB Transcription Involved in Gamma-Poly-Glutamic Acid Synthesis.', *Biosci Biotechnol Biochem* Vol. 73, No. 9, 2096-102, 2009.
- Ongena, M, and P Jacques. 'Bacillus Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol.', *Trends Microbiol* Vol. 16, No. 3, 115-25, 2008.
- Ongena, M, E Jourdan, A Adam, M Paquot, A Brans, B Joris, JL Arpigny, and P Thonart. 'Surfactin and Fengycin Lipopeptides of *Bacillus subtilis* as Elicitors of Induced Systemic Resistance in Plants.', *Environ Microbiol* Vol. 9, No. 4, 1084-90, 2007.
- Osera, C, G Amati, C Calvio, and A Galizzi. 'Swraa Activates Poly-Gamma-Glutamate Synthesis in Addition to Swarming in *Bacillus subtilis*.', *Microbiology* Vol. 155, No. Pt 7, 2282-7, 2009.

- Overbeek, R, N Larsen, T Walunas, M D'Souza, G Pusch, E Jr Selkov, K Liolios, V Joukov, D Kaznadzey, I Anderson, A Bhattacharyya, H Burd, W Gardner, P Hanke, V Kapatral, N Mikhailova, O Vasieva, A Osterman, V Vonstein, M Fonstein, N Ivanova, and N Kyrpides. 'The ERGO Genome Analysis and Discovery System.', *Nucleic Acids Res* Vol. 31, No. 1, 164-71, 2003.
- Pansegrau, W, E Lanka, PT Barth, DH Figurski, DG Guiney, D Haas, DR Helinski, H Schwab, VA Stanisich, and CM Thomas. 'Complete Nucleotide Sequence of Birmingham IncP Alpha Plasmids. Compilation and Comparative Analysis.', *J Mol Biol* Vol. 239, No. 5, 623-63, 1994.
- Paz, MM, GS Kumar, M Glover, MJ Waring, and M Tomasz. 'Mitomycin Dimers: Polyfunctional Cross-Linkers of DNA.', *J Med Chem* Vol. 47, No. 12, 3308-19, 2004.
- Pichinoty, F, JL Garcia, C Job, and M Durand. '[Denitrification by *Bacillus licheniformis*]', *Can J Microbiol* Vol. 24, No. 1, 45-9, 1978.
- Podlesek, Z, A Comino, B Herzog-Velikonja, D Zgur-Bertok, R Komel, and M Grabnar. '*Bacillus licheniformis* Bacitracin-Resistance ABC Transporter: Relationship to Mammalian Multidrug Resistance.', *Mol Microbiol* Vol. 16, No. 5, 969-76, 1995.
- Purdy, D, TA O'Keeffe, M Elmore, M Herbert, A McLeod, M Bokori-Brown, A Ostrowski, and NP Minton. 'Conjugative Transfer of Clostridial Shuttle Vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through Circumvention of the Restriction Barrier.', *Mol Microbiol* Vol. 46, No. 2, 439-52, 2002.
- Qi, ZD, Y Lin, B Zhou, XD Ren, DW Pang, and Y Liu. 'Characterization of the Mechanism of the *Staphylococcus aureus* Cell Envelope by Bacitracin and Bacitracin-Metal Ions.', *J Membr Biol* Vol. 225, No. 1-3, 27-37, 2008.
- Qiu, D, K Fujita, Y Sakuma, T Tanaka, Y Ohashi, H Ohshima, M Tomita, and M Itaya. 'Comparative Analysis of Physical Maps of Four *Bacillus subtilis* (Natto) Genomes.', *Appl Environ Microbiol* Vol. 70, No. 10, 6247-56, 2004.

- Raaijmakers, JM, I de Bruijn, O Nybroe, and M Ongena. 'Natural Functions of Lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More Than Surfactants and Antibiotics.', *FEMS Microbiol Rev*, 2010.
- Raleigh, EA, and G Wilson. '*Escherichia coli* K-12 Restricts DNA Containing 5-Methylcytosine.', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 83, No. 23, 9070-4, 1986.
- Reents, H, R Münch, T Dammeyer, D Jahn, and E Härtig. 'The Fnr Regulon of *Bacillus subtilis*.' *J Bacteriol* Vol. 188, No. 3, 1103-12, 2006.
- Rey, M. W., P. Ramaiya, B. A. Nelson, S. D. Brody-Karpin, E. J. Zaretsky, M. Tang, A. Lopez de Leon, H. Xiang, V. Gusti, I. G. Clausen, P. B. Olsen, M. D. Rasmussen, J. T. Andersen, P. L. Jorgensen, T. S. Larsen, A. Sorokin, A. Bolotin, A. Lapidus, N. Galleron, S. D. Ehrlich, and R. M. Berka. 'Complete Genome Sequence of the Industrial Bacterium *Bacillus licheniformis* and Comparisons with Closely Related *Bacillus* Species', *Genome Biol* Vol. 5, No. 10, R77, 2004.
- Reyrat, JM, V Pelicic, B Gicquel, and R Rappuoli. 'Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis.', *Infect Immun* Vol. 66, No. 9, 4011-7, 1998.
- Roberts, MC. 'Update on Acquired Tetracycline Resistance Genes.', *FEMS Microbiol Lett* Vol. 245, No. 2, 195-203, 2005.
- Roberts, RJ, M Belfort, T Bestor, AS Bhagwat, TA Bickle, J Bitinaite, RM Blumenthal, SKh Degtyarev, DT Dryden, K Dybvig, K Firman, ES Gromova, RI Gumpert, SE Halford, S Hattman, J Heitman, DP Hornby, A Janulaitis, A Jeltsch, J Josephsen, A Kiss, TR Klaenhammer, I Kobayashi, H Kong, DH Krüger, S Lacks, MG Marinus, M Miyahara, RD Morgan, NE Murray, V Nagaraja, A Piekarowicz, A Pingoud, E Raleigh, DN Rao, N Reich, VE Repin, EU Selker, PC Shaw, DC Stein, BL Stoddard, W Szybalski, TA Trautner, JL Van Etten, JM Vitor, GG Wilson, and SY Xu. 'A Nomenclature for Restriction Enzymes, DNA Methyltransferases, Homing Endonucleases and Their Genes.', *Nucleic Acids Res* Vol. 31, No. 7, 1805-12, 2003.

- Roberts, RJ, T Vincze, J Posfai, and D Macelis. 'Rebase--a Database for DNA Restriction and Modification: Enzymes, Genes and Genomes.', *Nucleic Acids Res* Vol. 38, No. Database issue, D234-6, 2010.
- Romero, D, A Pérez-García, JW Veening, A de Vicente, and OP Kuipers. 'Transformation of Undomesticated Strains of *Bacillus subtilis* by Protoplast Electroporation.', *J Microbiol Methods* Vol. 66, No. 3, 556-9, 2006.
- Roncero, MI. 'Genes Controlling Xylan Utilization by *Bacillus subtilis*.', *J Bacteriol* Vol. 156, No. 1, 257-63, 1983.
- Ruhfel, RE, NJ Robillard, and CB Thorne. 'Interspecies Transduction of Plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*.', *J Bacteriol* Vol. 157, No. 3, 708-11, 1984.
- Rutherford, K, J Parkhill, J Crook, T Horsnell, P Rice, MA Rajandream, and B Barrell. 'Artemis: Sequence Visualization and Annotation.', *Bioinformatics* Vol. 16, No. 10, 944-5, 2000.
- Sakaya, N., S. Kaneko, S. Matsunaga, and M. Itaya. 'Experimental Basis for a Stable Plasmid, pLS30, to Shuttle between *Bacillus subtilis* Species by Conjugational Transfer', *Journal of Biochemistry* Vol. 139, No. 3, 557-561, 2006.
- Sambrook, Joseph. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual / Joseph Sambrook, David W. Russell*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- Sanger, F, S Nicklen, and AR Coulson. 'DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors.', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 74, No. 12, 5463-7, 1977.
- Sanger, F. 'DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. 1977.', *Biotechnology* Vol. 24, 104-8, 1992.
- Schallmey, M, A Singh, and OP Ward. 'Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production.', *Can J Microbiol* Vol. 50, No. 1, 1-17, 2004.
- Schwarzer, D, and MA Marahiel. 'Multimodular Biocatalysts for Natural Product Assembly.', *Naturwissenschaften* Vol. 88, No. 3, 93-101, 2001.

- Schwarzer, M., 'Untersuchungen zur Regulation des Aminosäure-Stoffwechsels von *Bacillus licheniformis* DSM13', Dissertation, 2010.
- Shingaki, R, Y Kasahara, T Inoue, S Kokeguchi, and K Fukui. 'Chromosome DNA Fragmentation and Excretion Caused by Defective Prophage Gene Expression in the Early-Exponential-Phase Culture of *Bacillus subtilis*.', *Can J Microbiol* Vol. 49, No. 5, 313-25, 2003.
- Shuman, S. 'Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase.', *J Biol Chem* Vol. 269, No. 51, 32678-84, 1994.
- Simon, R., U. Prierer, and A. Pühler. 'A Broad Host Range Mobilization System for *In vivo* Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria', *Bio-Technology* Vol. 1, No. 9, 784-791, 1983.
- Smits, WK, CC Eschevins, KA Susanna, S Bron, OP Kuipers, and LW Hamoen. 'Stripping *Bacillus*: ComK Auto-Stimulation Is Responsible for the Bistable Response in Competence Development.', *Mol Microbiol* Vol. 56, No. 3, 604-14, 2005.
- Spizizen, J. 'Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus subtilis* by Deoxyribonucleate.', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 44, No. 10, 1072-8, 1958.
- St John, FJ, JD Rice, and JF Preston. 'Characterization of XynC from *Bacillus subtilis subsp. subtilis* Strain 168 and Analysis of Its Role in Depolymerization of Glucuronoxylan.', *J Bacteriol* Vol. 188, No. 24, 8617-26, 2006.
- Staden, R. 'The Staden Sequence Analysis Package', *Molecular Biotechnology* Vol. 5, No. 3, 233-241, 1996.
- Staden, R., K. F. Beal, and J. K. Bonfield. 'The Staden Package, 1998', *Methods Mol Biol* Vol. 132, 115-30, 2000.

- Stewart, FJ, D Panne, TA Bickle, and EA Raleigh. 'Methyl-Specific DNA Binding by McrBC, a Modification-Dependent Restriction Enzyme.', *J Mol Biol* Vol. 298, No. 4, 611-22, 2000.
- Stone, KJ, and JL Strominger. 'Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C55 -Isoprenyl Pyrophosphate.', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 68, No. 12, 3223-7, 1971.
- Strätz, M., U. Sauer, A. Kuhn, and P. Dürre. 'Plasmid Transfer into the Homoacetogen *Acetobacterium woodii* by Electroporation and Conjugation', *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 60, No. 3, 1033-1037, 1994.
- Subramaniyan, S, and P Prema. 'Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application.', *Crit Rev Biotechnol* Vol. 22, No. 1, 33-64, 2002.
- Tangney, Martin, Børge Diderichsen, and Fergus G. Priest. 'A Method for Electrotransformation of *Bacillus licheniformis* NCIB 6346 by Plasmid DNA', *Biotechnology Techniques* Vol. 8, No. 7, 463-466, 1994.
- Tech, M, and R Merkl. 'YACOP: Enhanced Gene Prediction Obtained by a Combination of Existing Methods.', *In Silico Biol* Vol. 3, No. 4, 441-51, 2003.
- Tock, MR, and DT Dryden. 'The Biology of Restriction and Anti-Restriction.', *Curr Opin Microbiol* Vol. 8, No. 4, 466-72, 2005.
- Trieu-Cuot, P, C Carlier, P Martin, and P Courvalin. 'Plasmid Transfer by Conjugation from *Escherichia coli* to Gram-Positive Bacteria', *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 48, No. 1-2, 289-294, 1987.
- Tsong, TY. 'Electroporation of Cell Membranes.', *Biophys J* Vol. 60, No. 2, 297-306, 1991.

- Vanittanakom, N, W Loeffler, U Koch, and G Jung. 'Fengycin--a Novel Antifungal Lipopeptide Antibiotic Produced by *Bacillus subtilis* F-29-3.', *J Antibiot (Tokyo)* Vol. 39, No. 7, 888-901, 1986.
- Veith, B., C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche, K. H. Maurer, P. Ehrenreich, S. Baumer, A. Henne, H. Liesegang, R. Merkl, A. Ehrenreich, and G. Gottschalk. 'The Complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an Organism with Great Industrial Potential', *J Mol Microbiol Biotechnol* Vol. 7, No. 4, 204-11, 2004.
- Villafane, R, DH Bechhofer, CS Narayanan, and D Dubnau. 'Replication Control Genes of Plasmid pE194.', *J Bacteriol* Vol. 169, No. 10, 4822-9, 1987.
- Voigt, B, Antelmann, H, Albrecht, D, Ehrenreich, A, Maurer, KH, Evers, S, Gottschalk, G, van Dijk, JM, Schweder, T, Hecker, M. 'Cell physiology and protein secretion of *Bacillus licheniformis* compared to *Bacillus subtilis*.' *J Mol Microbiol Biotechnol*, Vol. 16, 53-68
- Volpon, L, F Besson, and JM Lancelin. 'Nmr Structure of Antibiotics Plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* Inhibitors of Phospholipase a(2).', *FEBS Lett* Vol. 485, No. 1, 76-80, 2000.
- Vos, Paul De. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Volume 3 ; the Firmicutes*, Williams & Wilkins, 2009.
- Waack, S, O Keller, R Asper, T Brodag, C Damm, WF Fricke, K Surovcik, P Meinicke, and R Merkl. 'Score-Based Prediction of Genomic Islands in Prokaryotic Genomes Using Hidden Markov Models.', *BMC Bioinformatics* Vol. 7, 142, 2006.
- Waite-Rees, PA, CJ Keating, LS Moran, BE Slatko, LJ Hornstra, and JS Benner. 'Characterization and Expression of the *Escherichia coli* Mrr Restriction System.', *J Bacteriol* Vol. 173, No. 16, 5207-19, 1991.

- Waschkau, B., J. Waldeck, S. Wieland, R. Eichstadt, and F. Meinhardt. 'Generation of Readily Transformable *Bacillus licheniformis* Mutants', *Appl Microbiol Biotechnol* Vol. 78, No. 1, 181-8, 2008.
- Waters, VL. 'Conjugation between Bacterial and Mammalian Cells.', *Nat Genet* Vol. 29, No. 4, 375-6, 2001.
- Wilson, G. G., and N. E. Murray. 'Restriction and Modification Systems', *Annu Rev Genet* Vol. 25, 585-627, 1991.
- Wood, HE, KM Devine, and DJ McConnell. 'Characterisation of a Repressor Gene (Xre) and a Temperature-Sensitive Allele from the *Bacillus subtilis* Prophage, PBSX.', *Gene* Vol. 96, No. 1, 83-8, 1990.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. Decruz, M. Noyerweidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, and M. W. Graham. 'Quantitative-Evaluation of *Escherichia coli* Host Strains for Tolerance to Cytosine Methylation in Plasmid and Phage Recombinants', *Nucleic Acids Research* Vol. 17, No. 9, 3469-3478, 1989.
- Wray, LV Jr, AE Ferson, and SH Fisher. 'Expression of the *Bacillus subtilis* UreABC Operon Is Controlled by Multiple Regulatory Factors Including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H.', *J Bacteriol* Vol. 179, No. 17, 5494-501, 1997.
- Xue, G. P., J. S. Johnson, and B. P. Dalrymple. 'High Osmolarity Improves the Electro-Transformation Efficiency of the Gram-Positive Bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*', *Journal of Microbiological Methods* Vol. 34, No. 3, 183-191, 1999.
- Yan, X, HJ Yu, Q Hong, and SP Li. 'Cre/Lox System and PCR-Based Genome Engineering in *Bacillus subtilis*.', *Appl Environ Microbiol* Vol. 74, No. 17, 5556-62, 2008.

- Yoon, Sung Ho, Jin Hwan Do, Sang Yup Lee, and Ho Nam Chang. 'Production of Poly-Glutamic Acid by Fed-Batch Culture of *Bacillus licheniformis*', *Biotechnology Letters* Vol. 22, No. 7, 585-588, 2000.
- Yu, BJ, KH Kang, JH Lee, BH Sung, MS Kim, and SC Kim. 'Rapid and Efficient Construction of Markerless Deletions in the *Escherichia coli* Genome.', *Nucleic Acids Res* Vol. 36, No. 14, e84, 2008.
- Yu, H, X Yan, W Shen, Y Shen, J Zhang, and S Li. 'Efficient and Precise Construction of Markerless Manipulations in the *Bacillus subtilis* Genome.', *J Microbiol Biotechnol* Vol. 20, No. 1, 45-53, 2010.
- Zeigler, D. R., Z. Pragai, S. Rodriguez, B. Chevreux, A. Muffler, T. Albert, R. Bai, M. Wyss, and J. B. Perkins. 'The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains', *Journal of Bacteriology* Vol. 190, No. 21, 6983-6995, 2008.

7. Anhang

Tab. A1: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (fettmarkierte Buchstaben kennzeichnen Restriktionsschnittstellen)

Oligonukleotide Sequenz (5' → 3')

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')
ABI1	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
ABI2	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
Kon1	TTGCT GGCGCC ACCAAACGACGAGCGTGACA
Kon2	TTGCT GGCGCC CCTTCCTTTCTCGCCACGTTT
Tet1	TGCATT CTAG ACTCCTCCTTTACACTTTAATTC
Tet2	TGCAT GTCG ACTTGTAAATCACGTA CTCT CTTTG
Vec1	TGCATA CTAG TCTGTCAGACCAAGTTTACTC
Vec2	TGCATA CTAG TGTTAAGGGATGCATAAACTGC
Vec3	TGCAT CTCG AGGCGTGTGACAGTCCTTAAAT
Met1	TGCTA CCAT GGATTAACGGCATTGCTAGACG
Met2	TGCTA GGAT CCCTGCCATATGTTTGCCTCAC
Met3	TGCAT CATAT GTAATGTTTGCAGGAGGTATAAT
Met4	TCACTATAGGGCGAATTGG
PBSX1	CCTTCGCAGGAAAGTTTCTC
PBSX2	TGCT CCAT GGCGGTTTCTTTCTTTGTTGTC
PBSX3	CAAAGGGACAACATTTTCGGAGCAATACCTTGAATCTAATC
PBSX4	GATTAGATTCAAGGTATTGCTCCGAAAATGTTGTCCCTTTTG
PBSX5	TGCT GAATT CTGTTCGAATCGCTTCTGTTA
PBSX6	TCAATGAGCATCTGTTTATCG
Bh1	CGCTGTCTTATCTGTTATGG

Bh2	TGCT GGATCC GCCACTCTGTTGCTCTGATT
Bh3	GTGTATCGCGGGAAGCAATTGCTCACCCATATGCGAGTAA
Bh4	TACTCGCATATGGGTGAGCAATTGCTTCCCGCGATACAC
Bh5	TGCT GAATTC CAGGGAAGCTGTACACAGTT
Bh6	GTTCAAGCGGGAATCGAAAT
pMAD1	TCCTCTGGCCATTGCTCTG
pMAD2	GCCGGAAGCGAGAAGAATC
VecH1	GGAAACTAAATTTTTTCAGCCCGTCGACGTCATATGGATC
VecH2	CATGGCATGCATCGATAG
VecH3	GTCGACGTCATATGGATC
VecH4	CTTCTCCTTCGTAGGTCAACCATGGCATGCATCGATAG
Ure1	CAAAAATTCTCTCACAGGCTTCGGCTGATTTACATCATCAATA
Ure2	CAATCTTTAAATGGCGGTTACT
Ure3	CGGCTGATTTACATCATCAATA
Ure4	GGTTACAGCAGTTTCTTCCCAATCTTTAAATGGCGGTTACT
Arg1	GATCCATATGACGTCGACGGGCTGAAAAATTTAGTTTCC
Arg2	AAGCCTGTGAGAGAATTTTTG
Arg3	GGGCTGAAAAATTTAGTTTCC
Arg4	TATTGATGATGTAAATCAGCCGAAGCCTGTGAGAGAATTTTTG
Arg5	CTATCGATGCATGCCATGGTTGACCTACGAAGGAGAAG
Arg6	GGGAAGAACTGCTGTAACC
Arg7	GTTGACCTACGAAGGAGAAG
Arg8	AGTAACCGCCATTTAAAGATTGGGGAAGAACTGCTGTAACC
Ins1	AACGCCAGGCTCTTGATCG

Ins2	TGGGCAGGAAGAAAAGCTGG
Ins3	GGGCAGGAACAGTTATTGG
Ins4	TTACAATCGCCCCGGGAAGG
Trp1	GGGTGCGCATGATCCTCTAGAGT
Trp2	TAAATTGCACTGAAATCTAGAAATA

Tab. A2: Auflistung der potentiellen Fremdgene, die durch "Island Viewer" identifiziert werden konnten: die Gene sind mit ihren Gennummern, Start- / Stoppositionen und Annotation angegeben.

Gennummer	Start	Stop	Annotation
BaLi_c19650	1928787	1929248	hypothetisches Protein
BaLi_c19660	1929888	1929499	hypothetisches Protein
BaLi_c19670	1930390	1931526	RapE:"response"-Regulator Aspartatphosphatase
BaLi_c19680	1931516	1931653	hypothetisches Protein
BaLi_c19690	1931855	1933663	mögliche Transposase
BaLi_c19700	1933675	1934067	hypothetisches Protein
BaLi_c19710	1935375	1934389	hypothetisches Protein
BaLi_c26190	2573577	2572915	ABC Transporter (ATP-binde Protein)
BaLi_c26200	2574235	2573693	hypothetisches Protein
BaLi_c26210	2575292	2574681	<i>bcrC</i> : Bacitracin-Transporter (Permease)
BaLi_c26220	2576147	2575413	<i>bcrB</i> : Bacitracin-Transporter (Permease)
BaLi_c26230	2577081	2576140	<i>bcrA</i> : Bacitracin-Transporter (ATP-binde Protein)
BaLi_c26240	2578174	2577140	hypothetisches Protein
BaLi_c26250	2578877	2578161	hypothetisches Protein
BaLi_c26260	2598115	2579036	<i>bacC</i> : Bacitracin Synthetase 3
BaLi_c26270	2606043	2598220	<i>bacB</i> : Bacitracin Synthetase 2
BaLi_c26280	2621925	2606155	<i>bacA</i> : Bacitracin Synthetase 1
BaLi_c28660	2843336	2842767	hypothetisches Protein
BaLi_c28670	2844425	2843577	hypothetisches Protein
BaLi_c28680	2845410	2845084	hypothetisches Protein

BaLi_c28690	2845946	2845374	hypothetisches Protein
BaLi_c28700	2846075	2846692	mögliche Methyltransferase
BaLi_c28710	2847896	2846742	konserviertes hypothetisches Protein
BaLi_c28720	2848281	2848700	hypothetisches Protein
BaLi_c28730	2849487	2848786	<i>narI2</i> : Nitrat-Reductase (gamma Untereinheit)
BaLi_c28740	2850071	2849508	<i>narJ2</i> : Nitrat-Reductase (delta Untereinheit)
BaLi_c28750	2851593	2850043	<i>narH2</i> : Nitrat-Reductase (beta Untereinheit)
BaLi_c28760	2855266	2851583	<i>narG2</i> : Nitrat-Reductase (alpha Untereinheit)
BaLi_c28770	2856815	2855319	Nitrat/Nitrit-Transporter
BaLi_c28780	2857125	2858345	mögliche Flavohemoprotein
BaLi_c28790	2858774	2858490	hypothetisches Protein
BaLi_c28800	2859641	2859048	Transkriptionsregulator
BaLi_c28810	2859730	2860440	hypothetisches Protein
BaLi_c28820	2860677	2861999	mögliche Transposase
BaLi_c28830	2862518	2862072	hypothetisches Protein
BaLi_c38140	3796054	3794915	UDP-N-Acetylmannosamin 2-Epimerase
BaLi_c38150	3796416	3797294	UTP-Glukose-1-Phosphat-Uridylyltransferase
BaLi_c38160	3797769	3797365	hypothetisches Protein
BaLi_c38170	3797874	3797785	hypothetisches Protein
BaLi_c38180	3798004	3797882	hypothetisches Protein
BaLi_c38190	3798672	3798403	hypothetisches Protein
BaLi_c38200	3800486	3799176	hypothetisches Protein
BaLi_c38210	3803927	3800550	hypothetisches Protein
BaLi_c38220	3805391	3805495	hypothetisches Protein
BaLi_c38230	3805919	3806251	mögliche Transposase
BaLi_c38240	3806269	3806670	hypothetisches Protein
BaLi_c43020	4322392	4323531	zwei-Komponenten-Sensor-Histidinkinase
BaLi_c43030	4323528	4324130	zwei-Komponenten-"response"-Regulator
BaLi_c43040	4327280	4324578	mögliche Helicase

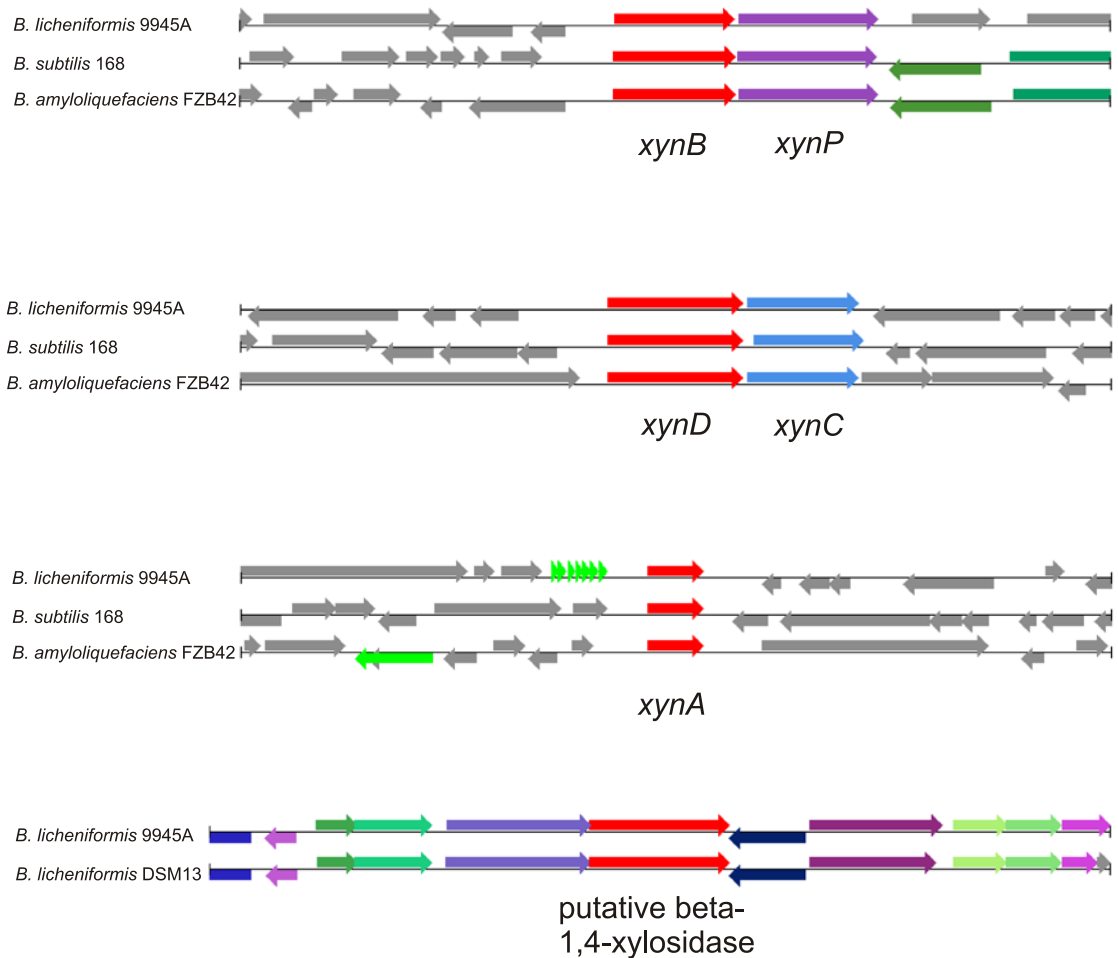


Abb. A1: Genetische Organisation der Gene des Xylan-Abbaus in *B. licheniformis* 9945A, *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42: Gene sind als Pfeile gekennzeichnet, die die Leserichtung wiedergeben; orthologe Gene sind in gleicher Farbe dargestellt; graue Pfeile stellen flankierende Gene dar; konnte den Genen aus *B. licheniformis* 9945A kein entsprechendes Gen in einem der anderen Organismen zugeordnet werden, wurde dieser nicht aufgelistet.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Referenten PD Dr. Rolf Daniel für seine stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Vielen Dank für dein reges Interesse und Engagement am Fortgang dieser Arbeit.

Prof. em. Dr. Gerhard Gottschalk danke ich für die Übernahme des Koreferates und dafür, dass er stets Zeit hatte, wenn ich mit einem Anliegen zu ihm kam.

Prof. Dr. Wolfgang Liebl möchte ich für seine Hilfe und Unterstützung danken, die auch aus dem fernen München zu spüren waren.

Mein Dank gilt Axel Strittmatter für sein Vertrauen, dass er von Anfang an in mich gesetzt hat, seine Bereitschaft alles stehen und liegen zu lassen, um mir bei meinen Problemen zu helfen und mich stets daran zu erinnern, nicht an zu vielen Projekten gleichzeitig zu arbeiten.

Heiko Liesegang danke ich dafür, dass er meine Betreuung übernommen hat, als Axel Strittmatter Göttingen verließ. Weiterhin kann ich behaupten, dass er durch seine stete Bereitschaft zur Diskussion und Beiträgen zur Lösung von Problemen einen entscheidenden Einfluss auf diese Arbeit hatte.

Weiterhin möchte ich mich bei Armin Ehrenreich bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

An dieser Stelle gilt mein Dank ebenfalls unserem Kooperationspartner der Firma Henkel, Dr. Karl-Heinz Maurer, Dr. Stefan Evers und Dr. Johannes Bongaerts, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Stefanie Pöggeler, Prof. Dr. Botho Bowien und Prof. Dr. Heinz Neumann als Mitglieder der Prüfungskommission.

Außerdem möchte ich mich bei Antje Wollherr bedanken, dass sie immer Zeit für einen "bioinformatischen Laien" hatte, wenn er mit Fragen und Problemen zu ihr kam.

Mein Dank gilt auch PD Dr. Michael Hoppert, für die Hilfe und die Bereitstellung von Geräten und Chemikalien für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Weiterhin möchte ich allen ehemaligen und derzeitigen Laborkollegen und Mitgliedern des G2L danken. Mein Dank gilt Claudia, Sebastian, Daniela, Katrin H., Marvin, John, Andreas, Daniela, Marco, Melanie, Eilika, Claudia, Anja, Desiree, Christina, Silke, Christl, Sandra, Sarah, Katrin A., Robert, Carla, Sascha, Frauke, Kathleen, Steffie und Melissa, nicht zu vergessen Sonja Volland, Sonja Voget, Jörg, Anja, Ela, Jörn und Arnim. Danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Rüdiger Lehmann für die Aufbereitung der Genomdaten und speziell für seine schnelle Hilfe kurz vor Abgabe dieser Arbeit bedanken, Mechthild Bömeke für die Einführung in die Welt der Southernblot-Analyse, Andrea Thürmer für die 454-Sequenzierung und Kathleen Gollnow für die geleisteten Sequenzierarbeiten (ohne dich hätte ich das Genomprojekt nicht so schnell abschließen können).

Ein großes Dankeschön gilt Andrea Thürmer, Anja Pöhlein, Sonja Volland, Jörg Schuldes, Heiko Liesegang und PD Rolf Daniel für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen weiteren Mitgliedern des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

Mein Dank gilt meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Ein besonderer Dank gilt auch meinen zukünftigen Schwiegereltern.

Zuletzt möchte ich mich bei der wichtigsten Person in meinem Leben bedanken, meiner Verlobten Julia, die mir durch ihre Liebe die Kraft und die Entschlossenheit gegeben hat, dies hier zu schaffen. Danke für deine unendliche Geduld und dein Verständnis all die Jahre.

Lebenslauf

19. Juli 1981	geboren in Gunzenhausen deutsche Staatsbürgerschaft
9/1987 bis 7/1991	Besuch der Grundschule, Absberg
9/1991 bis 6/2001	Besuch des Simon-Marius-Gymnasiums, Gunzenhausen Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
11/2001 bis 7/2002	Wehrdienst im Jagdgeschwader 74 „Mölders“, Neuburg an der Donau
10/2002 bis 6/2007	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Bayreuth
8/2006 bis 6/2007	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Meyer am Lehrstuhl für Mikrobiologie mit dem Thema "Das Genom von <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5"
5/2008	Anmeldung zu vorliegender Promotion am G2L im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August- Universität Göttingen