

Physiologische Untersuchungen zur
Regulation des Aminosäure-Stoffwechsels von
Bacillus licheniformis DSM13

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Marco Schwarzer
aus Langenhagen

Göttingen 2010

D7

Referent: Prof. Dr. W. Liebl

Korreferent: PD Dr. R. Daniel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2010

*für meine Frau
und meine Kinder*

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	2
2.1. Stoffwechseländerungen zur Bewältigung unterschiedlicher Wachstumsumstände	2
2.2. Einsatz von DNA-Microarray Technologie zur globalen Genexpressionanalyse	6
2.3. Biologie von <i>Bacillus licheniformis</i>	8
2.4. Ziele der Arbeit.....	9
3. Material und Methoden	11
3.1 Organismen und Plasmide.....	11
3.2. Nährmedien, Puffer und Standardlösungen.....	12
3.2.1. Komplexe Medien	12
3.2.2. Definierte Medien	13
3.2.3. Medienzusätze	16
3.3. Zellanzucht und Stammhaltung.....	17
3.3.1. Zellanzucht von <i>B. licheniformis</i> aus der Stammkultur	17
3.3.2. Zellanzucht unter anaeroben Wachstumsbedingungen	17
3.3.3. Zellanzucht unter aeroben Wachstumsbedingungen.....	17
3.3.4. Ermittlung der maximalen Wachstumsrate	18
3.3.5. Zellanzucht von <i>B. licheniformis</i> in kontinuierlicher Kultur	19
3.3.6. Reinheitskontrolle	22
3.3.7. Stammhaltung.....	22
3.4. Techniken für das Arbeiten mit DNA	23
3.4.1. Lösungen und Puffer für das Arbeiten mit DNA	23
3.4.2. Isolierung und Darstellung von DNA	25
3.4.2.1. Isolierung chromosomaler DNA	25
3.4.2.2. Extraktion und Fällung von DNA	25
3.4.2.3. Kochlyse.....	26
3.4.2.4. Verkürzte Isolierung von DNA	26

3.4.2.5.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	27
3.4.2.6.	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	27
3.4.2.7.	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.4.2.8.	Eckhardt-Lyse.....	28
3.4.2.9.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	29
3.4.2.10.	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	29
3.4.3.	Restriktion und Modifikation von DNA.....	30
3.4.3.1.	Restriktion.....	30
3.4.3.2.	Dephosphorylierung.....	30
3.4.3.3.	Ligation.....	30
3.4.4.	DNA-Transfertechniken.....	31
3.4.4.1.	DNA-Transfer mittels Hitze-Transformation.....	31
3.4.4.2.	DNA-Transfer mittels Protoplasten-Transformation.....	32
3.4.4.3.	DNA-Transfer mittels Konjugation.....	34
3.4.4.4.	Southern-Blot.....	35
3.5.	Erstellung von <i>clean deletion</i> - Mutanten.....	40
3.6.	Techniken für das Arbeiten mit RNA.....	42
3.6.1.	Lösungen und Puffer zum Arbeiten mit RNA.....	42
3.6.2.	Isolierung von RNA aus <i>B. licheniformis</i>	43
3.6.3.	DNase-Verdau und Kontrolle der RNA.....	44
3.6.4.	Extraktion und Fällung von RNA.....	44
3.6.5.	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	45
3.6.6.	Qualitätskontrolle der RNA.....	45
3.6.6.1.	Elektrophorese von RNA.....	45
3.6.6.2.	Bioanalyzer.....	46
3.6.6.3.	Kontrolle der RNA-Integrität.....	46
3.7.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
3.7.1.	PCRs für den Southern-Blot.....	47
3.7.2.	GeneSOEing-PCRs.....	48
3.7.3.	Kolonie-PCR.....	50
3.7.4.	PCR zur Überprüfung auf DNA-Reste.....	50
3.7.5.	Reverse Transkriptions-PCR.....	51
3.7.6.	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR.....	52

3.8.	Hybridisierung und Auswertung von Microarrays	54
3.8.1.	Markierung von RNA mit Cy3/Cy5 Fluoreszenzfarbstoff.....	55
3.8.2.	Aufreinigung der markierten cDNA	58
3.8.3.	Überprüfung der Markierungsreaktion.....	59
3.8.4.	Hybridisierung der cDNA	60
3.8.5.	Quantifizierung der Microarraydaten mit GenePix Pro 6.0	64
3.8.6.	Analyse der Transkriptionsdaten.....	67
3.9.	Analyse von Kulturüberständen	68
3.9.1.	Dünnschichtchromatographie (DC)	68
3.9.2.	Ionenchromatographie (IC).....	70
3.9.2.1.	Quantitative Bestimmung von Alkoholen und Zuckern	70
3.9.2.2.	Quantitative Bestimmung von Anionen.....	72
3.9.2.3.	Quantitative Bestimmung von Kationen.....	75
3.9.2.4.	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	75
3.9.3.	Gas-Chromatographie (GC).....	77
3.9.4.	Quantitative Bestimmung von Acetat	77
3.9.5.	Quantitative Bestimmung von Acetoin.....	78
3.9.6.	Quantitative Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff	78
3.10.	Oligonukleotide.....	79
3.11.	Enzyme	81
3.12.	Chemikalien und sonstige Geräte	81
4.	Ergebnisse.....	82
4.1.	Untersuchungen zum anaeroben Wachstum.....	82
4.1.1.	Anaerobe Verwertung von Zuckern durch <i>B. licheniformis</i>	82
4.1.2.	Transkriptionsanalysen zum fermentativen Wachstum	83
4.1.2.1.	Vergleichende Genexpressionsanalyse des Wachstums unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen	84
4.1.2.2.	Verifizierung ausgewählter Daten der DNA-Microarray-Experimente durch <i>real-time</i> RT-PCR	97
4.1.3.	Bestimmung von Fermentationsendprodukten.....	98
4.2.	Untersuchungen zur Verwertung von C2-Metaboliten	100
4.2.1.	Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle.....	100
4.2.2.	Transkriptionsanalysen zum Wachstum mit Acetat.....	101

4.2.3.	Wachstum mit 2,3-Butandiol als Kohlenstoffquelle.....	105
4.2.4.	Transkriptionsanalysen zum Wachstum mit 2,3-Butandiol	106
4.3.	Untersuchungen zur Verwertung von Aminosäuren.....	109
4.3.1.	Wachstum mit einzelnen Aminosäuren.....	109
4.3.1.1.	Verwertung einzelner Aminosäuren als Wachstumskomponenten.....	109
4.3.1.2.	Transkriptionsanalysen zur Verwertung einzelner Aminosäuren	110
4.3.1.2.1.	Einmünden der Aminosäuren in den Zentralmetabolismus	111
4.3.1.2.2.	Gene mit gleicher Genexpression	120
4.3.1.2.3.	Gene mit unterschiedlicher Genexpression.....	122
4.3.1.2.4.	Genexpressionsdaten weiterer Enzyme.....	123
4.3.1.3.	Verifizierung ausgewählter Daten aus DNA-Microarray-Experimenten durch <i>real-time</i> RT-PCR	125
4.3.2.	Wachstum mit Gemischen von Aminosäuren.....	127
4.3.2.1.	Verwertung eines Gemisches aus sieben Aminosäuren.....	128
4.3.2.2.	Transkriptionsanalysen zur Verwertung eines Gemisches aus sieben Aminosäuren	130
4.3.2.3.	Verwertung eines Gemisches aus 20 Aminosäuren	134
4.3.2.4.	Transkriptionsanalysen zur Verwertung eines Gemisches aus 20 Aminosäuren	137
4.4.	Charakteristische Gene für <i>B. licheniformis</i>.....	146
4.5.	Transkriptionsanalysen im Vergleich: PCR-basierende Genomchips vs. Oligo-basierende Genomchips.....	150
4.6.	Erstellung und phänotypische Charakterisierung von Mutanten.....	155
5.	Diskussion	163
5.1.	Wachstum von <i>B. licheniformis</i> DSM13 unter anaeroben Kultivierungsbedingungen	163
5.2.	Wachstum mit C2-Metaboliten.....	175
5.3.	Wachstum mit Aminosäuren.....	180
5.4.	Ausblick.....	205
6.	Literaturverzeichnis	206
7.	Anhang.....	222

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary</i>)
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
d.h.	das heißt
dCTP	Desoxyribocytosin-5'-triphosphat
DH	Dehydrogenase
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
Ed.	Editor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alteri (und andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid

g	Gramm
G	Guanin
Glc	Glucose
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen
Konz.	Konzentration
l	Liter
log	dekadischer Logarithmus
Lsg.	Lösung
m	Milli (10^{-3})
M	Molar (Mol/Liter)
min	Minute
mol	Mol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger</i>)
n	Nano (10^{-9})
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
Nr.	Nummer
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung
p	Pico (10^{-12})
p.A.	<i>pro analysis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
psi	Pfund-Kraft pro Quadratzoll
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfate</i>)
SSC	<i>Saline Sodium-Citrate</i> (-Puffer)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Zusammenfassung

Im Gegensatz zu anderen Vertretern seiner Gattung ist *Bacillus licheniformis* fähig durch reine Fermentation zu wachsen. Unter Verwendung eines definierten Mediums konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *B. licheniformis* DSM13 unter anaeroben Kultivierungsbedingungen neben Glucose auch Fructose zum Wachstum nutzen kann, nicht jedoch die in diesem Kontext gewählten Pentosen. In Expressionsanalysen, welche in dieser Arbeit mittels DNA-Microarrays erfolgten, konnten für die Gene einer putativen Pyruvat-Formiat-Lyase, welche die Umsetzung von Pyruvat zu Formiat katalysiert, und dem offensichtlich zugehörigen Aktivierungsenzym eine erhöhte Expression unter fermentativen Wachstumsbedingungen ermittelt werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der im Kulturüberstand detektierten Zunahme von Formiat. Daneben konnten in dieser Arbeit mittels Ionenchromatographie 2,3-Butandiol, Lactat, Acetat und Glycerol als Fermentationsprodukte bestimmt werden.

Neben der Verfügbarkeit von Sauerstoff beeinflussen noch weitere Faktoren den natürlichen Lebensraum von Mikroorganismen. So sind diese in der Natur einer Reihe von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen ausgesetzt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass *B. licheniformis* DSM13 sieben von 18 proteinogenen Aminosäuren als C- und N-Quelle nutzen kann. Durch anschließende Transkriptionsanalysen konnten charakteristische Gene im Zusammenhang mit dem Wachstum auf Aminosäuren identifiziert werden. Für eine Auswahl dieser Gene konnten diese durch DNA-Microarray-Analysen ermittelten Expressionswerte via *real-time* RT-PCR verifiziert werden. Im Weiteren dienten Analysen der Kulturüberstände dazu, die Verwertung von Aminosäuren in Gemischen von diesen zu untersuchen. Hierzu wurde ein definiertes Medium entworfen, welches der Aminosäurezusammensetzung der Sojabohne nachempfunden war. In diesem Zusammenhang konnte mittels Ionenchromatographie eine Akkumulation von Ammonium, Acetat, Harnstoff, Ornithin und im Weiteren ein Verbrauch des Ornithins detektiert werden. Weiterhin wurden im Einklang mit den durchgeführten Transkriptionsanalysen erste phänotypische Charakterisierungen von Mutanten eines putativen Methylcitratzyklus in *B. licheniformis* durchgeführt.

2. Einleitung

In ihren natürlichen Habitaten sind Mikroorganismen unterschiedlichen Lebens- und Umwelteinflüssen ausgesetzt. Gekennzeichnet sind diese unter anderem durch die Verfügbarkeit verschiedener Nährstoffe, an welche das Wachstum der Mikroorganismen gebunden ist. Zum einen ist hier das Vorhandensein von Nährstoffen in Form von Kohlenstoff- und Energiequellen zu nennen, aber auch das Vorhandensein von möglichen Stickstoffquellen. Ein weiterer Faktor, der das Wachstum von Mikroorganismen beeinflusst ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff. Diese und weitere verschiedene Einflüsse führen zu der enormen Stoffwechselvielfalt der Mikroorganismen, mit welcher sie sich ihrem Habitat fortwährend neu anpassen können. Im Folgenden werden einige Stoffwechsellösungen herausgegriffen und einführend beschrieben, die im Rahmen dieser Dissertation von Bedeutung sind.

2.1. Stoffwechseländerungen zur Bewältigung unterschiedlicher Wachstumsumstände

Anaerobes Wachstum

Einer Reihe von Bakterien ist es möglich in Abwesenheit von externen Elektronenakzeptoren, wie Sauerstoff oder Nitrat, durch Fermentation zu wachsen. Diese sind zum einen fakultativ anaerobe Bakterien, die sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff wachsen können und zum anderen obligat anaerobe Mikroorganismen, für welche der Sauerstoff im allgemeinen toxisch ist.

Während der Glykolyse werden durch die Oxidation von Hexosen, wie Glucose, zu Pyruvat zwei Moleküle NADH gebildet. Bei Fermentationen wird zur Regeneration des NAD^+ Pyruvat zu verschiedenen Gärprodukten reduziert und diese ausgeschieden. Essenziell ist hierbei, dass die Redoxbilanz zwischen Substraten und Gärprodukten ausgeglichen ist. Ohne die Regeneration des NAD^+ , welches nur in geringen Mengen in der Zelle vorhanden ist, kommt die Oxidation der Hexosen und damit verbunden die Bildung von ATP zum Erliegen. Gebildet wird ATP in der Regel über Substratkettenphosphorylierungen, die mit den oxidativen Reaktionen einer Fermentation gekoppelt sind. Als ein wichtiges Enzym der Substratkettenphosphorylierung kann beispielhaft die

Acetatkinase (Fox & Roseman, 1986) angeführt werden. Diese katalysiert die Bildung von Acetat und ATP aus Acetylphosphat und ADP. Neben Acetat produzieren einige Enterobakterien auch 2,3-Butandiol, welches durch Reduktion von Acetoin durch die Butandiol-Dehydrogenase entsteht (Blomqvist et al., 1993). Beides sind Produkte der gemischten Säuregärung, die unter anderem auch von Vertretern der Gattung *Bacillus* betrieben wird (Shariati et al., 1995).

Abbau von Aminosäuren

Neben Zuckern sind Aminosäuren häufige Substrate für das Wachstum von Mikroorganismen. Sie bilden die monomeren Einheiten von Proteinen und enthalten zwei wichtige funktionelle Gruppen, eine Carboxylgruppe (-COOH) und eine Aminogruppe (-NH₂). Diese beiden Gruppen bilden unter Abspaltung eines Wassermoleküls die Peptidbindung, welche für Proteine charakteristisch ist. Aminosäuren unterscheiden sich in der Art ihrer Seitengruppen, welche zum Großteil ihre chemischen Eigenschaften bestimmen.

Bei den Aminosäuren gibt es, wie auch bei den Zuckern, Stereoisomere. Die meisten in der Natur vorkommenden Aminosäuren liegen als L-Aminosäuren vor. D-Aminosäuren, welche z.B. als Bestandteil des Mureins in Bakterien vorkommen, können durch Racemasen in ihre L-Form umgewandelt werden.

Für den ersten Schritt im Abbau von Aminosäuren, der Entfernung der α -Aminogruppe, gibt es drei Möglichkeiten. Die einleitende Reaktion der **oxidativen Desaminierung** ist die Oxidation der Aminogruppe einer Aminosäure in eine Iminogruppe. Dieses Imino-Intermediat wird im Anschluss daran zu NH₃ und einer α -Oxosäure hydrolysiert. Beispielhaft für Aminosäure-Dehydrogenasen, welche diese Oxidation mit NAD⁺ als Co-Faktor katalysieren, können die Glutamat-Dehydrogenase (Hemmilä & Mäntsälä, 1978) oder die Alanin-Dehydrogenase (O'Connor & Halvorson, 1960) angeführt werden. Alternativ können die Aminosäuren durch relativ substratunspezifische Aminosäureoxidasen oxidiert und desaminiert werden. Die Oxidation mittels **Transaminierung** setzt sich aus den folgenden zwei Schritten zusammen. Zunächst überträgt die α -Aminosäure ihre NH₂-Gruppe auf 2-Oxoglutarat oder Pyruvat aus dem Zentralstoffwechsel. Durch die sich anschließende oxidative Desaminierung der gebildeten Produkte L-Glutamat oder L-Alanin wird der NH₂-Akzeptor wieder regeneriert. Eine dritte Möglichkeit stellt die **Desaminierung**

durch β -Eliminierung dar. Voraussetzung für diese Reaktionen ist, dass die Eliminierung am α -C-Atom durch geeignete Substituenten am β -C-Atom erleichtert wird. Katalysiert wird die Eliminierung von Ammoniak vom α -C-Atom bei den Aminosäuren Serin, Cystein und Threonin, welche in der β -Stellung zur Carboxylgruppe eine Hydroxyl- oder Thiolgruppe enthalten, durch Dehydratasen oder Desulphydrasen. Bei Aminosäuren mit einer Carboxylat-, Imidazol- bzw. Benzolgruppe als Substituenten am β -C-Atom, wie Aspartat, Histidin und Phenylalanin, wird die Eliminierungsreaktion von Aminosäure-Ammoniak-Lyasen katalysiert. C-C-Lyasen katalysieren die Eliminierung von Ammoniak bei den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Sie enthalten am β -C-Atom einen aromatischen oder heterozyklischen Substituenten. Die weiteren Abbauewege der stickstofffreien Derivate der Aminosäuren führen zu Intermediaten des Zentralstoffwechsels.

Zentralstoffwechsel

Neben der Glykolyse und dem Pentosephosphat-Weg gehört auch der Tricarbonsäurezyklus zu den zentralen Stoffwechselwegen. Zu ihren Hauptfunktionen gehören die Generierung von ATP und NADH, sowie die Bereitstellung von Intermediaten für anabole Reaktionen. Im Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus, Abb. 2.1) wird die Acetyl-Gruppe des Acetyl-CoAs zu CO_2 oxidiert, wobei die Reduktionsäquivalente auf NAD^+ , NADP^+ und FAD übertragen werden. Acetyl-CoA gelangt in diesen Zyklus durch eine von der Citrat-Synthase katalysierten Reaktion, in welcher Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat kondensiert. Die Aconitat-Hydratase isomerisiert im Anschluss daran Citrat zu Isocitrat, welches durch die Isocitrat-Dehydrogenase zu 2-Oxoglutarat oxidiert wird. Katalysiert durch den 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase Multienzymkomplex wird dieses unter Bildung von NADH zu Succinyl-CoA oxidiert. Die energiereiche Thioesterbindung des Succinyl-CoAs wird anschließend durch die Succinat-CoA-Synthase hydrolysiert und zur Bildung von ATP verwendet. Unter Freisetzung von FADH_2 wird das gebildete Succinat, katalysiert durch die Succinat-Dehydrogenase, zu Fumarat oxidiert. Ausgehend vom Fumarat sind noch zwei weitere Reaktionen zur Bildung von Oxalacetat notwendig. Zunächst hydratisiert die Fumarat-Hydratase Fumarat zu Malat, welches im Weiteren durch die Malat-Dehydrogenase unter Reduktion von NAD^+ zu dem Acetyl-CoA-Akzeptor Oxalacetat oxidiert wird.

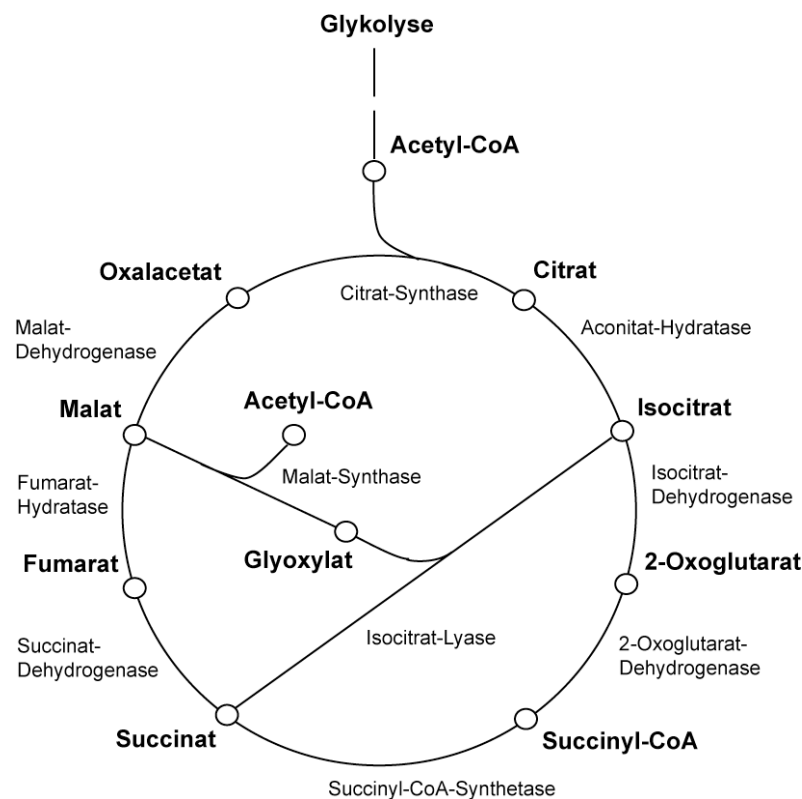


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Tricarbonsäurezyklus und des Glyoxylatzyklus. Neben den ausgehend von der Glykolyse abgebildeten Intermediaten sind des Weiteren die beteiligten Enzyme dargestellt.

Glyoxylatzyklus

Gemeinsam mit weiteren Enzymen des Tricarbonsäurezyklus bilden die Enzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase den Glyoxylatzyklus. Organismen, welche diesen besitzen, sind befähigt mit C2-Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen. Beispielhaft können in diesem Zusammenhang *Escherichia coli* (Chung et al., 1988) und *Corynebacterium glutamicum* (Reinscheid et al., 1994a; Reinscheid et al., 1994b) angeführt werden. Die anaplerotische Funktion des Glyoxylatzyklus liegt in der Versorgung des TCA-Zyklus mit dem Acetyl-CoA-Akzeptor Oxalacetat (Abb. 2.1). Nachdem Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert, wird letzteres zu Isocitrat umgesetzt. Anders als im TCA-Zyklus wird dieses nicht zu 2-Oxoglutarat umgewandelt, sondern durch die Isocitrat-Lyase zu Glyoxylat und Succinat gespalten. Das zweite Enzym des Glyoxylatzyklus, die Malat-Synthase, katalysiert im Anschluss die

Kondensation des Glyoxylats mit einem weiteren Acetyl-CoA zu Malat, welches wiederum zu Oxalacetat oxidiert werden kann.

Methylcitratzyklus

Der im Grunde analog zum Glyoxylatzyklus verlaufende Methylcitratzyklus wurde ursprünglich in der Hefe entdeckt (Tabuchi & Serizawa, 1975). Zwischenzeitlich konnte er aber auch bei verschiedenen Bakterien wie *E. coli*, *Salmonella typhimurium* LT2, *C. glutamicum* oder *Ralstonia eutropha* nachgewiesen werden (Textor et al., 1997; Horswill & Escalante-Semerena, 1997; Claes et al., 2002; Brämer & Steinbüchel, 2001). Anders als beim Glyoxylatzyklus kondensiert nicht Acetyl-CoA, sondern Propionyl-CoA beim Methylcitratzyklus mit Oxalacetat (Abb. 2.2). Das durch diese einleitende Reaktion gebildete Methylcitrat wird analog dem Glyoxylatzyklus zu Methylisocitrat umgesetzt. Katalysiert durch die Methylisocitrat-Lyase wird im Anschluss daran Methylisocitrat in Succinat und Pyruvat gespalten. Succinat kann durch die sich anschließenden Reaktionen des Tricarbonsäurezyklus zu dem Acetyl-CoA-Akzeptormolekül Oxalacetat umgesetzt werden. Pyruvat kann wiederum über Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust oder für biosynthetische Zwecke verwendet werden. Als Vorläufer des Propionyl-CoA kann Propionat oder ein Intermediat des Fettsäureabbaus dienen (Sonenshein, 2002).

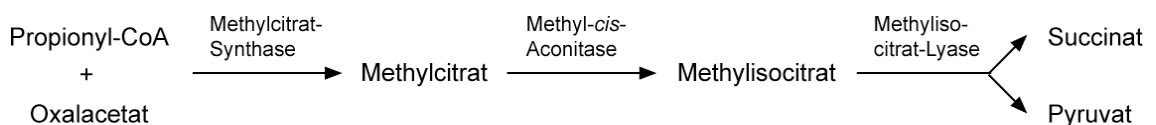


Abbildung 2.2: Putativer Abbauweg von Propionyl-CoA (nach Sonenshein, 2002). Erläuterung im Text.

2.2. Einsatz von DNA-Microarray Technologie zur globalen Genexpressionsanalyse

Eine wichtige Entwicklung auf dem Gebiet der globalen Genexpressionsanalyse stellt die Microarray-Technologie (Lander, 1999) dar. Zurückzuführen ist sie auf Ed Southern, der bereits in den 70er Jahren feststellte, dass markierte Nukleinsäuremoleküle mit immobilisierten Nukleinsäuremolekülen interagieren können

(Southern, 1975). Das Prinzip der Microarrays beruht auf der komplementären Basenpaarung von Nukleinsäuren. Auf der Oberfläche des Microarrays liegen kovalent gebunden einzelsträngige Nukleotidsequenzen aus bekannten Genen vor, welche nach einem definierten Muster angeordnet sind. Wird dieser Microarray nun mit verschiedenen markierter cDNA eines zu untersuchenden Zustandes A bzw. Zustandes B inkubiert, kann nur der ihr komplementäre Strang binden (Abb. 2.3).

Ein Verfahren, um die Nukleinsäuren auf die Oberfläche eines Microarrays zu platzieren, ist das Kontaktprinting. Hierbei werden gereinigte Nukleinsäuren in winzigen Tröpfchen, pro Spot 100 pl, durch einen "Microarray-Spotter" auf die Glasoberfläche des Microarrays aufgebracht. Die Größe eines dieser Microarray-Chips ist etwa 2,5 x 7,5 cm, entspricht somit etwa der Größe eines Objektträgers. Es ist möglich, bis zu 20.000 Spots auf einen solchen Microarray aufzubringen, wobei die Größe eines Spots etwa 150 µm und der minimale Abstand der Spots voneinander 30 µm beträgt.

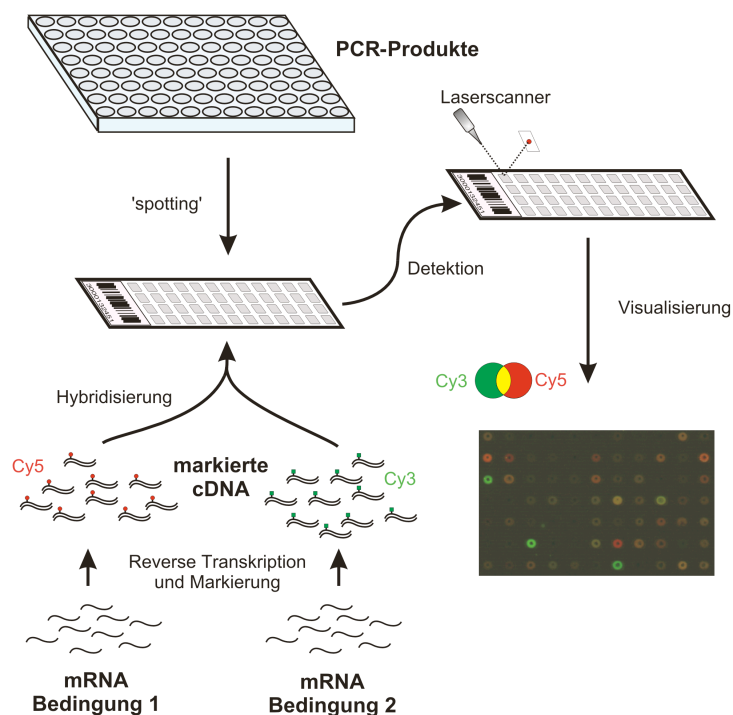


Abbildung 2.3: Schematische Übersicht des Ablaufs der DNA-Microarray-Analyse (Schmidt, 2005). Die gesamte RNA der Bedingungen 1 und 2 werden anhand der Reversen Transkription markiert und zusammen zur Hybridisierung des DNA-Microarrays eingesetzt. Die Detektion erfolgt mittels eines Laserscans mit definierten Wellenlängen und die relativen Fluoreszenzwerte werden im Anschluss daran softwaregestützt ausgewertet.

Die Transkriptionsanalyse untersucht die qualitative und quantitative Zusammensetzung der zellulären mRNA. In einem typischen Zweikanal-Transkriptionsanalyse-Experiment werden die relativen Expressionsstärken von zwei Proben, denen zwei unterschiedliche Zustände entsprechen, miteinander verglichen. Die erste Probe stellt hierbei einen Referenzwert dar, die zweite Probe wird aus Zellpopulationen gewonnen, deren Status untersucht werden soll. Es gilt zunächst die mRNA aus den Zellen der jeweiligen Probe zu isolieren und mittels der reversen Transkription in cDNA umzuschreiben. Jede dieser Proben wird währenddessen mit einem unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoff markiert und gleiche Mengen markierter Probe werden in eine Hybridisierung mit dem Microarray eingesetzt. Die Verwendung von Fluoreszenz hat den Vorteil, dass mehrere Proben in einem Experiment gleichzeitig ausgewertet werden können. Nach der Hybridisierung wird das mit jedem der beiden eingesetzten Farbstoffe korrespondierende Fluoreszenzsignal unabhängig voneinander gemessen. Im Anschluss an eine Normalisierung kann die Intensität der beiden Hybridisierungssignale miteinander verglichen werden (Blalock, 2003).

2.3. Biologie von *Bacillus licheniformis*

Zur Gattung *Bacillus* zählen in erster Linie chemoorganotrophe Gram-positive Stäbchen, die häufig in Paaren oder Ketten angeordnet und durch peritriche Flagellen beweglich sind (Sneath et al., 1986). Taxonomisch gehört *B. licheniformis* zur *Bacillus subtilis* Gruppe (Gruppe II), welche sich unter anderem dadurch auszeichnet, dass sie auf einer Vielfalt von Zuckern Säuren produzieren und einige von ihnen auch in der Abwesenheit von Sauerstoff wachsen können (Priest, 1993). Ihr vorrangiger Lebensraum ist der Boden. Durch ihre Fähigkeit zur Sporenbildung kann es aber zur ubiquitären Verbreitung kommen, dabei werden hitzebeständige Sporen vom Wind mit Bodenpartikeln aufgewirbelt und so weit verbreitet. Aufgrund dieser eben beschriebenen Eigenschaften nimmt die *B. subtilis* Gruppe eine Zwischenstufe zwischen den fakultativ anaeroben Bakterien der Gruppe I (*Bacillus polymyxa* Gruppe) und den strikt aeroben Stämmen der Gruppe III (*Bacillus brevis* Gruppe) und IV (*Bacillus sphaericus* Gruppe) ein (Priest, 1993).

B. licheniformis ist ein Organismus von biotechnologischer Relevanz. Seine Einsatzgebiete sind neben der Produktion von Proteasen, wie der α -Amylase (Yuuki et al., 1985), die fermentative Herstellung des Antibiotikums Bacitracin (Froyshov & Laland, 1974) und des Lipopeptids Lichenysin (Fiechter, 1992). Die Sequenzierung des Genoms von *B. licheniformis* DSM13 (Veith et al., 2004) ergab, dass dieses aus einem Chromosom mit einer Größe von 4.222.748 bp besteht und der durchschnittliche G+C Gehalt des Genoms bei 46,2% liegt. Des Weiteren weist DSM13 die vollständige Enzymausstattung für die zentralen Stoffwechselwege der Glykolyse, des Pentosephosphat-Wegs und des Tricarbonsäurezyklus auf. Daneben wurden Gene identifiziert, welche starke Homologien zur Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase aufweisen, den essentiellen Enzymen des Glyoxylatzyklus. Vorangegangene Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass DSM13 zum reinen fermentativen Wachstum befähigt ist (Schwarzer, 2005) und mit Propionat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann (Wülfing, 2006). Letzteres wird offensichtlich durch die Enzyme eines putativen Methylcitratzyklus ermöglicht.

2.4. Ziele der Arbeit

Basierend auf diesem Fundament wurde zum besseren Verständnis dieses biotechnologisch interessanten Organismus der Aminosäuremetabolismus von *B. licheniformis* DSM13 in dieser Arbeit untersucht. Es sollte dabei geklärt werden, welche Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können. Anhand von Transkriptionsanalysen sollten Gene bzw. Gruppen von Genen identifiziert werden, welche charakteristisch für das Wachstum mit einzelnen Aminosäuren sind. Im Anschluss daran galt es die aus diesen Experimenten gewonnen Erkenntnisse auf das Wachstum mit Gemischen von Aminosäuren zu transferieren. Zusätzlich sollten die Kulturüberstände beim Wachstum mit Gemischen von Aminosäuren analysiert werden. Dieses diente zum einen dazu, den Verbrauch bzw. eine etwaige Reihenfolge in der Verwertung von Aminosäuren zu detektieren und zum anderen mögliche Produkte zu identifizieren. Im Zusammenhang mit den physiologischen Untersuchungen zum Aminosäuremetabolismus in DSM13 wurden des Weiteren, unter Verwendung von

DNA-Microarrays, Transkriptionsanalysen zum fermentativen Wachstum und zur Verwertung von C2-Metaboliten durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Organismen und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme und Plasmidvektoren verwendet. Diese sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.1: Verwendete Organismen.

Stamm	Geno- / Phänotyp	Herkunft / Referenz
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	Wildtyp	DSMZ
<i>B. licheniformis</i> MW3	$\Delta hsdR1$, $\Delta hsdR2$	Waschkau et al., 2008
<i>B. licheniformis</i> $\Delta BLi04093$	$\Delta hsdR1$, $\Delta hsdR2$, $\Delta BLi04093$	Laborsammlung Göttingen
<i>B. licheniformis</i> $\Delta mmgD$	$\Delta hsdR1$, $\Delta hsdR2$, $\Delta mmgD$	Laborsammlung Göttingen
<i>B. licheniformis</i> $\Delta mmgE$	$\Delta hsdR1$, $\Delta hsdR2$, $\Delta mmgE$	diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> $\Delta yqiQ$	$\Delta hsdR1$, $\Delta hsdR2$, $\Delta yqiQ$	Laborsammlung Freising
<i>B. licheniformis</i> $\Delta citA$	$\Delta hsdR1$, $\Delta hsdR2$, $\Delta citA$	Laborsammlung Freising
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F-, <i>supE44</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, $\Delta lacU169$, <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , λ^-	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Priefer et al., 1985

Tabelle 3.2: Verwendete Plasmidvektoren.

Plasmid	Größe (kb)	Geno- / Phänotyp	Herkunft / Referenz
pMAD	9,666	oripE194 ^{ts} , oripBR322, <i>pclpB</i> , <i>bgaB</i> , <i>bla</i> , <i>ermC</i>	Arnaud et al., 2004
pKVM1	10,351	pMAD-Derivat, oriT, <i>traJ</i>	Rachinger, 2010

3.2. Nährmedien, Puffer und Standardlösungen

Medien, Puffer und Lösungen wurden mit *Milipore*-H₂O angesetzt und 20 min im Autoklaven bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Thermolabile Substanzen und Kohlenstoffquellen wurden gelöst und sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm, Sartorius, Göttingen). Zur Herstellung von festen Medien wurden 1,5% (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte bei 4°C.

3.2.1. Komplexe Medien

Die beiden folgenden Medien dienten neben der Anzucht von Vorkulturen auch der Sterilitätskontrolle und, unter Zugabe von 50 mM Glucose und entsprechender Antibiotika, dem Ausplattieren von Konjugationsansätzen.

LB (Luria-Bertani)-Medium

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
H ₂ O	ad 1000	ml

NB (Nutrient broth)-Medium

Nutrient broth	8	g
H ₂ O	ad 1000	ml

3.2.2. Definierte Medien

Für Transkriptionsanalysen, aber auch zur Analyse von Kulturüberständen ist es von Vorteil ein definiertes Medium zu verwenden. Aus diesem Grund wurde zur Anzucht von *B. licheniformis* mit definierter C-Quelle das in Tabelle 3.3 beschriebene Minimalmedium verwendet. Anzumerken ist, dass NH_4Cl , MgSO_4 , CaCl_2 und H_2O gemeinsam autoklaviert wurden, sämtliche weiteren Lösungen wurden getrennt sterilisiert und später steril hinzugegeben.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Minimalmediums zur Kultivierung mit definierter C-Quelle.

Bestandteil	Konzentration der Stammlösung	Menge	Konzentration im Medium
NH_4Cl	1M in H_2O	10 ml	10 mM
MgSO_4	500 mM in H_2O	1 ml	0,5 mM
CaCl_2	100 mM in H_2O	1 ml	0,1 mM
Phosphatpuffer	400 mM Na_2HPO_4 mit 400 mM KH_2PO_4 auf pH 7,5 eingestellt	100 ml	40 mM
SL9		1 ml	
C-Quelle	300 - 1000 mM	x ml	25 – 60 mM
H_2O		ad 1000 ml	

Neben den Untersuchungen mit definierter C-Quelle wurden in dieser Arbeit Experimente durchgeführt in denen die Verwertung von Aminosäuren untersucht wurde. Zunächst wurde die Verwertung von einzelnen Aminosäuren als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle durch DSM13 untersucht. Die Zusammensetzung des verwendeten Minimalmediums ist in Tabelle 3.4. dargestellt. MgSO_4 , CaCl_2 und H_2O wurden gemeinsam autoklaviert, sämtliche weiteren Lösungen wurden getrennt sterilisiert und anschließend der Reihe nach steril hinzugegeben.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Minimalmediums zur Kultivierung mit Aminosäuren.

Bestandteil	Konzentration der Stammlösung	Menge	Konzentration im Medium
MgSO ₄	500 mM in H ₂ O	1 ml	0,5 mM
CaCl ₂	100 mM in H ₂ O	1 ml	0,1 mM
Phosphatpuffer	400 mM Na ₂ HPO ₄ mit 400 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 7,5 eingestellt	100 ml	40 mM
SL9		1 ml	
C-/ N-Quelle	40 mM – 120 mM	x ml	30 mM
H ₂ O		ad 1000 ml	

Um das Wachstum auf Gemischen von Aminosäuren zu untersuchen, wurden als C-/ N-Quelle die in den folgenden Tabellen aufgeführten Aminosäuremixe verwendet. Die Aminosäuremixe 1 bis 5 stellen dabei die einzelnen Gruppen eines Gemisches dar, welches der Zusammensetzung des Aminosäuregehaltes der Sojabohne nachempfunden ist.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung Aminosäuremix 1.

Bestandteil	Einwaage der Stammlösung	Menge
SB-Mix 1		
L-Alanin	0,3538 g	
L-Arginin	0,6012 g	
L-Asparagin	0,4861 g	ad 50 ml
L-Asparaginsäure	0,4861 g	40°C H ₂ O

Tabelle 3.6: Zusammensetzung Aminosäuremix 2.

Bestandteil	Einwaage der	Menge
SB-Mix 2	Stammlösung	
L-Glutamin	0,7774 g	
L-Glutaminsäure	0,7774 g	
Glycin	0,3472 g	
L-Histidin	0,2102 g	ad 100 ml
L-Isoleucin	0,3778 g	40°C H ₂ O

Tabelle 3.7: Zusammensetzung Aminosäuremix 3.

Bestandteil	Einwaage der	Menge
SB-Mix 3	Stammlösung	
L-Leucin	0,6464 g	
L-Lysin	0,5306 g	
L-Methionin	0,1050 g	
L-Phenylalanin	0,4110 g	
L-Prolin	0,4562 g	
L-Serin	0,4256 g	
L-Threonin	0,3206 g	ad 100 ml
L-Valin	0,3990 g	40°C H ₂ O

Tabelle 3.8: Zusammensetzung Aminosäuremix 4.

Bestandteil	Einwaage der	Menge
SB-Mix 4	Stammlösung	
L-Cystein	0,1104 g	ad 100 ml
L-Tryptophan	0,1064 g	40°C H ₂ O

Tabelle 3.9: Zusammensetzung Aminosäuremix 5.

Bestandteil	Einwaage der	Menge
SB-Mix 5	Stammlösung	
Tyrosin	0,2602 g	ad 150 ml 40°C 10 mM NaOH

Spurenelementlösung 9 (SL9) (modifiziert nach Tschech & Pfennig, 1984)

Titriplex I (Nitrilotriacetat)	12,8	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2	g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19	g
MnCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1	g
ZnCl ₂	0,07	g
H ₃ BO ₃	0,006	g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024	g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002	g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,036	g
H ₂ O	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt. Nach dem Sterilfiltrieren erfolgte die Lagerung bei -20°C langfristig oder kurzfristig bei 4°C.

3.2.3. Medienzusätze

Soweit notwendig wurden weitere Zusätze in die Medien pipettiert. Diese Zugabe erfolgte nach dem Abkühlen der autoklavierten Nährlösungen auf mindestens 50°C.

Tabelle 3.10: Medienzusätze.

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Erythromycin	5 mg/ml in EtOH	5 µg/ml
Polymyxin B	40 mg/ml in H ₂ O	40 µg/ml
Thiamin-HCL	0,5 mg/ml in H ₂ O	1 µg/ml
X-GAL	40 mg/ml in N,N-Dimethylformamid ^a	40 µg/ml

a) vor Gebrauch frisch angesetzt.

3.3. Zellanzucht und Stammhaltung

3.3.1. Zellanzucht von *B. licheniformis* aus der Stammkultur

B. licheniformis wurde aus der Stammkultur in NB-Medium im 250 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen passagiert und in einem definierten Medium inokuliert. Am Ende der log-Phase (vgl. 3.3.4., Abb. 3.1) wurden diese Zellen ein zweites Mal in definiertes Medium überführt. Diese Kultur diente zur Bestimmung von Kulturüberständen und zur Zellanzucht für die Transkriptionsanalyse. Für das Wachstum auf Festmedien wurden die beimpften Agarplatten 1-2 Tage bei 37°C inkubiert.

3.3.2. Zellanzucht unter anaeroben Wachstumsbedingungen

Für die anaerobe Anzucht von *B. licheniformis* wurde dessen Fähigkeit, sowohl aerob als auch anaerob zu wachsen, genutzt. Die Anzucht von *B. licheniformis* erfolgte anaerob bei 37°C in Minimalmedium in 1000 ml Anaerobenflaschen. Hierzu wurde zum autoklavierten Minimalmedium Phosphatpuffer (pH 7,5) und die Kohlenstoffquelle bei einer Temperatur von ca. 70°C hinzugefügt. Bei etwa 50°C erfolgte die Zugabe der SL9-Lösung und des Thiamins, so dass ein Gesamtvolumen von insgesamt 500 ml entstand. Die Flaschen wurden mit einem Butyl-Stopfen verschlossen und im Anschluss daran erfolgte eine Übersichtung des Mediums mit Stickstoff. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mediumkomponenten zu gewährleisten, wurden die Flüssigkulturen in den Anaerobenflaschen auf einem Rotationsschüttler mit 100 U/min inkubiert.

3.3.3. Zellanzucht unter aeroben Wachstumsbedingungen

Um zum Beispiel Wachstumsparameter wie die maximale Wachstumsrate (siehe 3.3.4.) zu ermitteln, erfolgte die aerobe Zellanzucht von *B. licheniformis* DSM13 bei 37°C oder 42°C in statischer Kultur. In einem solchem geschlossenen System werden keine Nährstoffe zu- bzw. Stoffwechselprodukte abgeführt. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung durch Schwenken auf dem Rotationsschüttler (160 U/min) zu

gewährleisten, sollte die Gefäßgröße dem 10fachen Kulturvolumen entsprechen. Aus diesem Grund wurden für die erste Passage in definierten Medium 250 ml Erlenmeyer-Schikanekolben verwendet. Die Zellanzucht der zweiten Passage erfolgte in 1000 ml bzw. 5000 ml Erlenmeyer-Schikanekolben.

3.3.4. Ermittlung der maximalen Wachstumsrate

Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums und von verschiedenen Wachstumsbedingungen abhängig. Hierzu zählen z.B. die Art der C-, N- oder P-Quelle. Auch Faktoren wie Belüftung, Temperatur oder der pH-Wert der Nährlösung haben einen Einfluss. Um die maximale Wachstumsrate eines Organismus zu ermitteln, ist es erforderlich den Verlauf des Wachstums in einem geschlossenen System, einer statischen Kultur, zu verfolgen. In dieser Arbeit wurden die Wachstumskurven über indirekte Bestimmung der Zelldichte basierend auf der optischen Dichte der Zellkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt. Das Wachstum von Bakterien in einer statischen Kultur kann in mehrere Phasen unterteilt und anhand eines typischen Kurvenverlaufes dargestellt werden (Abb. 3.1).

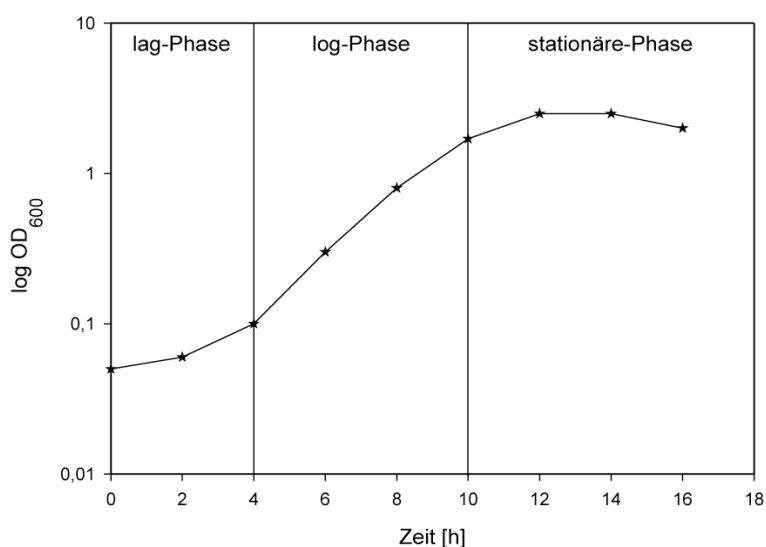


Abbildung 3.1: Wachstumskurve. Logarithmische Auftragung der Zelldichte (OD₆₀₀) über der Zeit und Unterteilung in die Wachstumsphasen.

In der ersten Phase, der lag-Phase, erfolgt zunächst eine Adaption der Zellen an die Wachstumsbedingungen. Eine Zunahme der Kulturdichte findet in dieser Phase kaum statt. Hieran schließt sich die so genannte log-Phase an, welche durch eine konstante Generationszeit unter optimaler Verwertung der zur Verfügung stehenden Energiequellen gekennzeichnet ist. In einem geschlossenen System erfolgt keine Zufuhr von Nährstoffen. Die Erschöpfung der ersten essentiellen Ressource leitet die stationäre Phase ein. Diese ist anhand eines Plateaus der Kurve zu erkennen. Neben der Begrenzung durch ein Substrat können auch eine hohe Zelldichte und die Ansammlung von Stoffwechselprodukten die stationäre Phase einleiten. In der stationären Phase findet kein Zellwachstum, aber Zellerhaltung durch Verwertung von Speicherstoffen statt. Sind alle Energiequellen verbraucht, beginnen die Bakterien abzusterben und zu lysieren. Dieses ist mit einer Abnahme der Zelldichte in der Suspension verbunden. Die maximale Wachstumsrate, welche in der log-Phase erreicht wird, kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\mu_{\max} = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$$

x_2	OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt 2
x_1	OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt 1
t_2	Zeitpunkt 2 [h]
t_1	Zeitpunkt 1 [h]

μ_{\max} besitzt die Einheit 1/h

3.3.5. Zellanzucht von *B. licheniformis* in kontinuierlicher Kultur

Für Transkriptionsanalysen ist es wünschenswert mit einer höchstmöglichen Reproduzierbarkeit der das Wachstum beeinflussenden Faktoren zu arbeiten. Zu diesem Zweck wurde *B. licheniformis* in einem definierten Medium mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle in kontinuierlicher Kultur angezogen. Die Stabilität dieses kontinuierlichen Systems beruht auf der Begrenzung der Wachstumsrate durch die Limitierung eines für das Wachstum notwendigen Substrates (C-, N- oder P-Quelle). Im Gegensatz zu einer statischen Kultur, in welcher sich die Kulturbedingungen fortwährend ändern, werden der wachsenden Bakterienpopulation einer kontinuierlichen Kultur laufend Nährmedium zugeführt und Bakteriensuspension abgeführt, um möglichst gleichbleibende Milieu- und somit Kulturbedingungen zu schaffen. Eine solche kontinuierliche Kultur stellt somit ein offenes System dar.

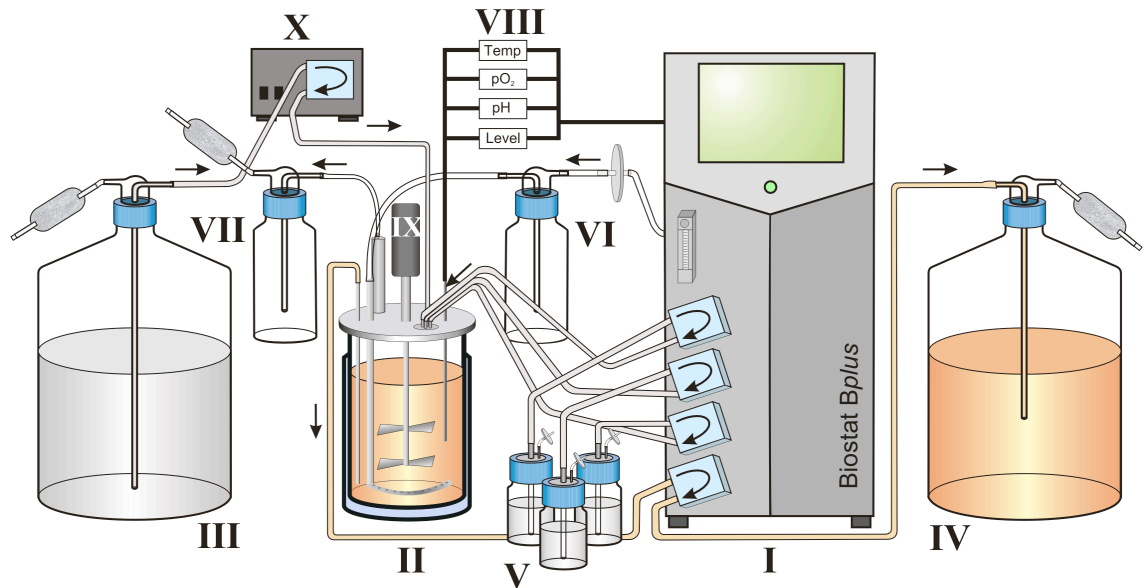


Abbildung 3.2: Aufbau des Chemostaten Biostat[®] B_{plus} der Firma Sartorius (schematische Darstellung nach Schmidt, 2005)

- I** Basiseinheit des Chemostaten zur Regulation von Temperatur, pO₂, und pH-Wert, sowie Mediumzulauf und Kulturabfluss
- II** Kulturgefäß mit Doppelmantel, welches zur Einstellung der Wachstumstemperatur der Kultur mit vorgeheiztem Wasser umspült wird (Anschlüsse zur Basiseinheit nicht dargestellt)
- III** Mediumvorratsflasche (Magnetrührer für gleichmäßige Verteilung der Mediumkomponenten nicht dargestellt)
- IV** Auffanggefäß für abgeführte Kultur; Probennehmer und Erntevorrichtung, die vom Abpumpschlauch abzweigen sind nicht dargestellt
- V** Vorratsflaschen für Säure (1 M), Base (1 M) und Antischaum
- VI** Pressluftversorgung mit 0,22 µm Filtereinheit und Waschflasche
- VII** Abluftvorrichtung
- VIII** Elektrodenanschlüsse zur Kontrolle von Temperatur, pO₂, pH-Wert und des Flüssigkeitsvolumens
- IX** Motor
- X** Substratpumpe

Sofern sich die Kultur im sogenannten Fließgleichgewicht befindet bleibt die Zelldichte annähernd konstant und die Zellen befinden sich im dauernden Wachstum (*steady state*). Beträgt das Volumen der Kultur V (l) und fließt die Nährlösung mit der konstanten Zuflussrate f [l/h] zu, so ergibt sich die Verdünnungsrate $D = f / V$ [1/h]. Wobei D den Volumenwechsel pro Stunde angibt. Die *steady state* Zelldichte bleibt nahezu unverändert, solange die maximale exponentielle Wachstumsrate μ größer ist als die Verdünnungsrate D , und D größer ist als die $\frac{1}{2}$ maximale exponentielle

Wachstumsrate. Entspricht die Verdünnungsrate D der Wachstumsrate μ , spricht man vom *balanced growth*, d.h. die relativen Anteile aller Zellbestandteile, wie z.B. Proteine, DNA, RNA und Lipide, bleiben konstant.

In dieser Arbeit wurde zur Anzucht in kontinuierlicher Kultur ein Chemostat der Firma Sartorius BBI Systems GmbH verwendet. Zum Einsatz kam das Modell BIOSTAT® *Bplus* mit einem Kesselvolumen von einem Liter (Abb. 3.2). Um die gewünschte Verdünnungsrate über eine konstante Zuflussrate des Mediums einzustellen wurde das gepumpte Volumen pro Minute (Schlauch: Masterflex® R96400-14; Pumpe: Watson-Marlow 101U/R) in Abhängigkeit der prozentualen Pumpleistung ermittelt. Im Anschluss daran wurde die pH-Elektrode bei der angegebenen Wachstumstemperatur geeicht.

Die Fermentationseinheit, bestehend aus dem Kulturgefäß mit Doppelmantel, welches mit 500 ml H₂O befüllt war und die pO₂-, pH- und Temperaturelektrode enthielt, leere Vorratsflaschen für Säure, Base und Antischaum, einer Abluftflasche mit Filter, sowie eine Zuluftapparatur, bestehend aus Filter und Waschflasche, wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. Separat wurden eine 20 l Vorratsflasche, befüllt mit H₂O für 10 l Minimalmedium, ebenso autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden der Vorratsflasche sämtliche weitere Zusätze steril zugegeben. Für die abzuführende Bakterienpopulation wurde eine 20 l Abfallflasche auch bei 121°C für 20 min autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die einzelnen Komponenten steril über Luer-Lock-Anschlüsse miteinander verbunden und die Elektroden und Pumpenschläuche an die Basiseinheit angeschlossen. Die drei leeren Vorratsflaschen wurden durch entsprechende Flaschen, welche 1 M HCl, 1 M NaOH bzw. 1% Antischaum enthielten, steril ausgetauscht.

Nach dem Abpumpen des H₂O aus dem Kulturgefäß wurde es mit Minimalmedium gespült und schließlich mit 500 ml Medium befüllt. Die Wachstumstemperatur von 37°C wurde eingestellt. Um die pO₂-Elektrode zu kalibrieren wurde das Medium zuerst mit Stickstoff bis zu einem minimalen Elektrodenstrom (Nullpunkt-Kalibrierung) und anschließend mit Pressluft bis zu einem maximalen Elektrodenstrom (Steilheitskalibrierung) begast. Die Kultur im Chemostaten wurde mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und unter ständigem Rühren bei 500 U/min, einem pH-Wert von 7,5 und einem Sauerstoffpartialdruck (pO₂) von 80% bis in die log-Phase in statischer Kultur angezogen. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 1 wurde die

Substratpumpe auf eine Durchflussrate von 0,4 eingestellt. Die Regulation des Kulturvolumens erfolgte über ein Ablaufrohr, welches an einer Pumpe angeschlossen war. Diese lief mit einer höheren Effizienz als die Zulaufpumpe, so dass nach dem Einstellen der Höhe des Abflussrohres sämtliches Kulturvolumen größer 500 ml abgepumpt wurde. Nach etwa 3 Volumenwechseln sollte sich ein stabiles Fließgleichgewicht der Kultur einstellen. Zeichnete sich dieses durch eine konstante Zelldichte aus, wurden die Zellen geerntet. Zur Überprüfung auf Reinheit wurde die Kultur täglich mikroskopisch und durch Ausstrich auf NB-Platten kontrolliert. Als weiterer Parameter zur Kontrolle wurde die Glucosekonzentration im Kulturüberstand mittels Ionenchromatographie bestimmt.

3.3.6. Reinheitskontrolle

Die Reinheitskontrolle von Kulturen erfolgte durch Vereinzelungsausstriche auf Komplexmediumsplatten und wurde ergänzt durch eine mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie.

3.3.7. Stammhaltung

Über einen Zeitraum von etwa 4 Wochen können Bakterienkulturen der Gattung *Bacillus* auf Agarplatten bei 4°C gelagert werden. Zur Vermeidung von Austrocknung und Kontaminationen wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen. Alle 1-2 Wochen sollten die Zellen auf eine frische Agarplatte überimpft werden.

Für die Langzeitkonservierung wurden Stammkulturen mit DMSO (Dimethylsulfoxid) oder 87%igem Glycerin angelegt. Dazu wurden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl DMSO bzw. Glycerin versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Mit diesen Kulturen können sowohl Fest- als auch Flüssigmedien direkt angeimpft werden.

3.4. Techniken für das Arbeiten mit DNA

3.4.1. Lösungen und Puffer für das Arbeiten mit DNA

Um eine Kontamination durch Nukleasen zu vermeiden, wurden alle thermostabilen Lösungen, Glaswaren und andere Materialien, die für das Arbeiten mit Nukleinsäuren notwendig waren, autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min) oder ggf. abgeflammt. Thermolabile Medienzusätze wurden sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm, Sartorius, Göttingen). Des Weiteren wurde der Arbeitsplatz durch regelmäßige Reinigung mit 70%igen Ethanol (v/v) sauber gehalten.

Calciumchlorid-Lösung

CaCl₂ 100 mM

autoklavieren

E1-Lösung (Lyselösung für Eckhardt-Gele)

Saccharose 25% (w/v)

Ficoll 400 10% (w/v)

vor Gebrauch sterile Zugabe von

5 mg/ml Lysozym

0,5 mg/ml RNaseA (Inkubation 15 min bei 100°C)

EDTA-Lösung (pH 8,0)

Na-EDTA 500 mM

pH-Wert mit NaOH einstellen, autoklavieren

Perchlorat-Lösung

NaClO₄ 5 M

Phosphatpuffer (pH 7,5)

Na₂HPO₄ 50 mM

pH-Wert mit 50 mM KH₂PO₄ einstellen, autoklavieren

SDS-Lösung

Natriumdodecylsulfat 10% (w/v)

sterilfiltrieren

10x S-Puffer (pH 8,8)

Tris 100 mM

KCl 500 mM

MgCl₂ 15 mM

STE-Puffer (pH 8,0)

Saccharose 6,7% (w/v)

Tris 50 mM

EDTA 1 mM

20x TAE-Puffer (DNA-Gelelektrophorese)

Tris 96,9 g

Essigsäure (100%) 22,8 ml

EDTA 3,8 g

H₂O ad 1000 ml

TE-Puffer (pH 8,0)

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

Tris-Puffer (pH 8,0)

Tris 1 M

pH-Wert mit HCl einstellen

3.4.2. Isolierung und Darstellung von DNA

3.4.2.1. Isolierung chromosomaler DNA (modifiziert nach Box, 2006)

Zur Isolierung chromosomaler DNA wurde das Pellet einer 10 ml Übernachtskultur in 1 ml STE-Puffer aufgenommen und anschließend bei 13000 U/min, -9°C für 2 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl STE-Puffer resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde eine Zelmühle verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Dismembrator (Mikro-Dismembrator U, Braun Biotech, Melsungen), in welchem eine Chromstahlkugel mit einer hohen Geschwindigkeit in einem mit flüssigem Stickstoff gekühltem PTFE-Zylinder hin und her geschlagen wird (3 min bei 1600 U/min). Auf diese Weise werden im Zylinder befindlichen Zellen zu einem feinen Pulver zermahlen. Dieses wurde in 3,8 ml STE-Puffer aufgenommen und der Reihe nach 480 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 40 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0) und 100µl RNase A (10 mg/ml; zuvor 10 min bei 100°C inkubiert) hinzugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 200µl Proteinase K (2,5 mg/ml). An eine Inkubation von 3 h bei 37°C schloss sich eine Extraktion der DNA mit Perchlorat/Chloroform/Isoamylalkohol an. Im Anschluss daran wurde die DNA mit Isopropanol gefällt (3.4.2.2.).

3.4.2.2. Extraktion und Fällung von DNA

Extraktion von DNA mit Perchlorat/Chloroform/Isoamylalkohol

Die Extraktion der DNA mit Perchlorat/Chloroform/Isoamylalkohol dient der Entfernung von Proteinen. Nach der Zugabe von 1,2 ml 5 M Perchlorat zur DNA-Lösung wurden 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) hinzugefügt und der Ansatz gevortext. Es folgte eine Zentrifugation bei 9000 U/min, RT für 10 min. Die DNA-haltige obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur weiteren Reinigung der DNA wurde die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol zwei weitere Male wiederholt. Die Fällung der DNA erfolgte im Anschluss mit Isopropanol.

Fällung von DNA mit Isopropanol

Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol Isopropanol (100%) versetzt. Nach 50x Schwenken wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation (9000 U/min, RT, 30 min) pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluss mit 500 µl –20°C kaltem 70%igen Ethanol (v/v) gewaschen. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 9000 U/min für 10 min. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das verbleibende DNA-Pellet bei 37°C im Thermoblock getrocknet. Gelöst wurde die DNA anschließend in sterilem H₂O und bei 4°C kurzfristig oder bei –20°C für einen längeren Zeitraum gelagert.

3.4.2.3. Kochlyse

Ein schnelles Verfahren zur Gewinnung eines DNA-haltigen Überstandes stellt die Kochlyse dar. Hierbei erfolgt die Lyse der Zellen physikalisch durch Aufkochen. Zellmaterial wurde in 40 µl sterilem H₂O resuspendiert und für 15 min bei 100°C im Thermoblock aufgeköcht. Anschließend wurde der Ansatz für 3 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand konnte direkt als Template in eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden.

3.4.2.4. Verkürzte Isolierung von DNA

Zur schnellen Isolierung von DNA aus *B. licheniformis* wurde Zellmaterial einer Kolonie in 450 µl STE-Puffer resuspendiert und anschließend 75 µl Lysozym (40 mg/ml) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden der Reihe nach 70 µl 10% SDS, 60 µl 0,5 M EDTA, 5 µl 1 M Tris und 150 µl 5 M Perchlorat hinzugegeben und für 30 min bei 10000 U/min zentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch 20 minütige Zentrifugation mit 1 Vol Isopropanol bei 10000 U/min gefällt. Der Überstand wurde verworfen, 500 µl 70% Ethanol zugegeben und erneut zentrifugiert. Nach der erneuten Abnahme des Überstandes wurde das verbleibende DNA-Pellet bei 37°C im Thermoblock getrocknet, anschließend in 30 µl sterilen H₂O aufgenommen und konnte direkt als Template in eine PCR eingesetzt werden.

3.4.2.5. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das QIAprep[®] Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen benutzt und laut mitgelieferter Versuchsvorschrift durchgeführt. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse in Verbindung mit einer Säule, an welche während der Aufreinigung Plasmid-DNA selektiv bindet. Proteine und auch andere zelluläre Verunreinigungen können nicht binden und werden somit abgetrennt. Die gewonnene DNA ist darüber hinaus frei von RNA, da bereits während der Lyse eine RNase-Behandlung erfolgt.

3.4.2.6. Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten ist es erforderlich, noch vorhandene dNTPs, Primer, Puffer und Enzym-Reste aus den PCR-Ansätzen zu entfernen. Dazu wurde das QIAquick[®] PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit der Abweichung, dass die Eluation der PCR-Produkte mit 70°C warmen sterilen H₂O erfolgte.

3.4.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mit der Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarose wurde in Abhängigkeit der zu untersuchenden Fragmentgrößen 0,8%ig (w/v) bzw. 1,5%ig (w/v) in 1x TAE-Puffer (3.4.1.) angesetzt, welcher auch als Elektrophoresepuffer diente. Die Agaroselösung wurde mit einer Temperatur von etwa 50°C in einen abgegrenzten Bereich einer Gellaufkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer bedeckt und der Taschenkamm entfernt. Die mit mindestens 1/5 Vol *Loading-Dye* versetzten Proben wurden nach vollständiger Durchmischung in die Geltaschen pipettiert. Der *Loading-Dye* diente einerseits zur Beschwerung der Proben, als auch zur Markierung der Lauffront. Für die Auftrennung der DNA-Proben im Gel wurde die Spannung bei 90 - 110 V konstant eingestellt und diese für etwa 45 - 60 min beibehalten, bis die Lauffront ca. 1,5 cm vom unteren Rand des Gels entfernt war. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte entsprechend ihrer Größe,

da deren Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrer Molekularmasse ist. Zusätzlich hängt die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente von weiteren Faktoren wie der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung, der Ionenkonzentration des Laufpuffers, sowie der Anwesenheit interkalierender Farbstoffe ab. Nach Beendigung des Laufes wurde die DNA für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (100 µl Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml ad 100 ml H₂O) gefärbt und das Gel anschließend in einem Wasserbad für 10 min entfärbt. In einer Gel-Dokumentationsanlage wurde die DNA bei UV-Licht (254 nm) durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Der Vergleich mit einem Standard erlaubte sowohl eine Größen-, als auch eine Mengenabschätzung der aufgetragenen DNA-Fragmente.

Für Proben mit einer Größe bis zu 10 kb wurden 3 µl der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) mit einem Größenstandard von 0,25 – 10 kb benutzt.

Fragmentlängen in bp:

250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000

3.4.2.8. Eckhardt-Lyse (Eckhardt, 1978, modifiziert nach Buhrmester, 2004)

Die Eckhardt-Lyse ist eine schnelle Methode zur Analyse des Plasmidgehalts eines Bakteriums. Sie lässt Rückschlüsse auf die Anzahl der Plasmide und der Plasmidgröße zu. Bei dieser Methode werden Bakterienzellen durch die Verwendung von Lysozym und SDS innerhalb der Taschen eines Agarosegels lysiert, so dass Scherkräfte vermieden werden. Anschließend erfolgt die gelelektrophoretische Auftrennung. Die chromosomale DNA der Bakterien ist zu groß um in das Agarosegel einwandern zu können und bleibt aus diesem Grund in den Geltaschen zurück.

Zur Herstellung des Gels wurde 0,8 - 1,0%ige Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer aufgeköcht. Nach dem Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 60°C erfolgte die Zugabe von 2 ml 10%igem SDS (w/v) pro 100 ml Agaroselösung. Diese Lösung wurde in eine Harnischmacher Kammer zu einem etwa 0,5 cm hohem Gel gegossen und der Kamm eingesetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Vorbereitung der Zellen. Hierbei wurden Zellen einer bakteriellen Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 5 µl TE-Puffer resuspendiert und nach der Zugabe von 20 µl E1-Lösung (mit 5 mg/ml Lysozym und

0,5 mg/ml RNaseA) vorsichtig gemischt. Nach dem Erstarren des Geles wurde dieses mit 1x TAE-Puffer überschichtet. 20 µl der Zellsuspension wurde nun auf das Gel aufgetragen und 5 min stehen gelassen. Der Vorlauf wurde ca. 30 - 40 min bei 20 V, bis zum Aufklaren der Geltaschen, durchgeführt. Die Auftrennung der Plasmide erfolgte für 90 - 120 min bei 100 V - 120 V. Zur Entfernung des SDS wurde das Gel unter Schwenken 4 x 30 min gewässert. Im Anschluss daran wurde das Gel für 20 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und 20 min in einem Wasserbad entfärbt. Die Detektion der angefärbten DNA erfolgte im UV-Licht (254 nm) mit einer Gel-Dokumentationsanlage.

3.4.2.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick[®] Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.4.2.10. DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde die Absorption im UV/VIS Spectrophotometer V-530 (JASCO, Groß-Umstadt) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei kam eine 1 ml Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke und einem Mindestvolumen von 50 µl zum Einsatz. Der Nullabgleich wurde mit H₂O eingestellt. Für eine OD₂₆₀ von 1 wurden folgende Konzentrationen angenommen (Sambrook et al., 1989):

dsDNA	50 µg/ml
ssDNA	40 µg/ml

Außerdem konnte die Reinheit einer DNA-Lösung durch Bestimmung der optischen Dichte bei 280 nm überprüft werden. Für reine DNA gilt (Sambrook et al., 1989):

$$OD_{260} : OD_{280} = 1,8$$

Verunreinigungen durch Proteine sind an einer deutlich stärkeren Absorption bei 280 nm erkennbar.

Eine weitere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen stellt das NanoDrop[®] ND 1000 Spectrophotometer dar. Hierzu wurde 1 µl Probe in die Lücke

zwischen zwei Glasfaserkabel pipettiert, so dass diese durch die Flüssigkeit überbrückt wurde. Ein Spectrometer analysierte das Licht, ausgehend von einer Xenon Lampe, nachdem es die Probe passiert hatte. Gesteuert wurde das Gerät über eine spezielle Software mit welcher die Daten auch archiviert werden konnten.

3.4.3. Restriktion und Modifikation von DNA

3.4.3.1. Restriktion

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche doppelsträngige DNA an spezifischen Basensequenzen schneiden. Hierbei können, je nach Enzym, freie glatte Enden, sogenannte *blunt ends* oder versetzte Enden, *sticky ends*, entstehen. Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen des Typs II wurde unter den vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen im Thermoblock für 2 Stunden durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden die Ansätze zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen für 15 min bei 65°C im Thermoblock inkubiert.

3.4.3.2. Dephosphorylierung

Nach der Restriktion (3.4.3.1.) wurde die Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Das Enzym entfernt die 5'-Phosphatgruppe von linearer DNA und verhindert so ein Religieren des Vektors. Die Dephosphorylierung mittels CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) der Firma Fermentas wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen im Thermoblock durchgeführt.

3.4.3.3. Ligation

Eine Restriktion von DNA-Fragmenten oder Vektoren mit den gleichen Restriktionsendonukleasen erzeugt komplementäre oder glatte Enden. DNA-Ligasen verknüpfen, unter Ausbildung von Phosphodiesterbrücken, endständige 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen miteinander. Für eine Ligation von DNA-Fragmenten wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Insert-Fragment gegenüber

Vektor-Fragment eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde nach Angaben des Herstellers mit der T4-DNA-Ligase der Firma Fermentas pipettiert und über Nacht bei 16°C in einer PCR-Maschine inkubiert. Die anschließende Inaktivierung erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

3.4.4. DNA-Transfertechniken

Für den horizontalen DNA-Transfer bei Prokaryonten gibt es mehrere bekannte Mechanismen:

Transformation: Aufnahme freier DNA aus der Umgebung

Konjugation: Transfer von DNA von einer Donor- zu einer Rezipientenzelle

Transduktion: Übertragung nicht viraler DNA durch temperente Phagen

Alle Formen des DNA-Transfers erfahren im Prinzip den gleichen limitierenden Schritt: Die DNA muss sich gegenüber den Restriktionsenzymen und Nukleasen durchsetzen und sich anschließend stabil im Rezipienten etablieren. Einschränkend wirken zudem eine Inkompatibilität der Plasmidübertragung und –replikation. Um eine homologe Rekombination ablaufen zu lassen muss außerdem eine ausreichende Homologie zwischen chromosomaler und aufgenommener DNA gegeben sein.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der DNA-Transfer mittels Transformation (3.4.4.1. und 3.4.4.2.) und Konjugation (3.4.4.3.).

3.4.4.1. DNA-Transfer mittels Hitze-Transformation

Für den Transfer von DNA mittels Hitze-Transformation wurde *Escherichia coli* S17-1 bzw. *E. coli* DH5 α verwendet. Die Herstellung der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte hierbei modifiziert in Anlehnung an eine Methode, die von Lederberg und Cohen (1974) beschrieben wurde. Die Transformation wurde modifiziert nach Morrison (1977) durchgeführt.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* S17-1

10 ml LB-Medium wurden mit 100 μ l einer *E. coli* S17-1 Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 bei 37°C inkubiert. Zum Ernten der Kultur wurde

diese bei 6000 U/min, 0°C für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 5 ml 100 mM CaCl₂-Lösung, ebenfalls 0°C, resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 6000 U/min, 0°C für 5 min wurden die Zellen in 1 ml 100 mM CaCl₂-Lösung (0°C) aufgenommen. Nach der Zugabe 200 µl Glycerin (87%) wurde der Ansatz in 100 µl Aliquots portioniert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

Hitze-Transformation *E. coli* S17-1

Für die Hitztransformation wurden zunächst 10 µl des zu transformierenden Ligationsansatzes zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben und anschließend vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation des Ansatzes auf Eis für 30 min erfolgte die Transformation bei 43°C für 90 sec. Zum Kuren der Zellen wurde dem Ansatz 1 ml LB-Medium zugefügt und für 60 min bei 37°C auf einem Rotationsschüttler (160 U/min) inkubiert. Abschließend wurden 100 µl und der abzentrifugierte Rest (Überstand verwerfen und Pellet in Rücklauf resuspendieren) auf Selektivplatten (LB/100 µg/ml Ampicilin) ausplattiert. Inkubation bei 37°C über Nacht.

3.4.4.2. DNA-Transfer mittels Protoplasten-Transformation

Bei der im folgenden vorgestellten Methode nach Chang und Cohen (1979) wurde das Plasmid pMAD in *B. licheniformis* MW3 transformiert. Bei diesem Stamm sind die beiden Typ I Restriktions-Modifikations-Systeme (Typ I RMS) des Wildtyps *B. licheniformis* DSM13 durch Deletion jeweils eines Gens des entsprechenden Operons (*hsdR1* und *hsdR2*) inaktiviert. RMS modifizieren die zelleigene DNA mit einem für den Organismus spezifischen Methylierungsmuster und bauen fremde DNA mit unterschiedlichem Methylierungsmuster ab, was ein großes Hindernis für die Transformation von *B. licheniformis* DSM13 mit DNA aus anderen Organismen darstellt. *B. licheniformis* MW3 lässt sich daher wesentlich besser als der Wildtyp transformieren.

Lösungen und Medien für die Protoplasten-Transformation

4 x PAB-Medium

Antibiotic broth/ Penassay broth	35	g
H ₂ O	ad 500	ml

autoklavieren

2 x SMM

2 M Sucrose	250	ml
1 M MgCl ₂	10	ml
0,08 M Maleinsäure pH 6,5	240	ml

Alle Komponenten getrennt autoklavieren und anschließend steril vereinigen.

SMMP

Zu gleichen Teilen 2 x SMM und 4 x PAB mischen.

SMMP+

SMMP mit 2% BSA

BSA in SMMP lösen und anschließend sterilfiltrieren.

DM3-Agar

4% Agar	100	ml
1 M Na-Succinat (pH 7,3)	250	ml
Phosphatpuffer (3,5% K ₂ HPO ₄ ; 1,5% KH ₂ PO ₄)	50	ml
10% Hefeextrakt	25	ml
5% Casaminoacids/ Casein Hydrolysat	50	ml
20% Glucose	12,5	ml
1 M MgCl ₂	10	ml
2% BSA	2,5	ml

Alle Komponenten getrennt autoklavieren bzw. sterilfiltrieren (Glucose und BSA), anschließend steril vereinigen.

Um eine Protoplasten-Transformation durchzuführen, wurde zunächst eine Vorkultur von *B. licheniformis* MW3 in 20 ml 1 x PAB-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte dabei in 250 ml Erlenmeyerkolben über Nacht bei 160 U/min und 37°C. Die darauffolgende 50 ml Hauptkultur wurde auf eine $OD_{600} = 0,2$ angeimpft und wiederum bei 160 U/min und 37°C inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,8 - 0,95 wurde die Hauptkultur durch eine zehnmünütige Zentrifugation (8000 U/min) bei 4°C geerntet und das Pellet anschließend in 5 ml SMMP resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und nach der Zugabe von 130 µl Lysozym (20 mg/ml in SMM) bei 30°C und 100 U/min inkubiert. Die Protoplastierung der Zellen wurde alle 30 min mikroskopisch überprüft. Nach etwa 2 Stunden war der Großteil der Zellen protoplastiert und konnten durch Zentrifugation in zwei Schritten geerntet werden. Die erste Zentrifugation erfolgte bei 4°C, 800 g für 10 min, der sich anschließende zweite Zentrifugationsschritt bei 4°C, 2000 g, ebenfalls für 10 min. Das daraus resultierende Pellet wurde in 10 ml SMMP resuspendiert und die Zentrifugationsschritte wiederholt. Das Pellet wurde in 2 ml SMMP resuspendiert. Je nach Anzahl der Ansätze wurden parallel hierzu in E-Cup-Reaktionsgefäße jeweils 10 µl DNA + 10 µl 2x SMM und in 15 ml Reaktionsgefäße jeweils 1,5 ml 40% Polyethylenglykol (PEG) 6000, gelöst in SMM, vorgelegt. Je 500 µl der Protoplastensuspension wurden in die E-Cup-Reaktionsgefäße gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde der Ansatz in die 15 ml Reaktionsgefäße, welche das PEG 6000 enthielten, überführt und nach erneutem vorsichtigen mischen für 2 min inkubiert. Nach der Zugabe von je 5 ml SMMP zu den Transformationsansätzen wurden diese bei 8°C wie oben beschrieben in zwei Schritten zentrifugiert. Das kaum sichtbare Pellet wurde in je 1 ml SMMP+ resuspendiert und bei 30°C inkubiert (100 U/min). Nach 1 Stunde wurden je Ansatz 10 µl Erythromycin (5 µg/ml) zugeben und eine weitere Stunde bei 30°C und 100 U/min inkubiert. Abschließend wurden die Ansätze auf DM3-Agar mit Erythromycin (5 µg/ml) ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

3.4.4.3. DNA-Transfer mittels Konjugation

Neben der Möglichkeit DNA mittels Transformation aufzunehmen stellt die Konjugation mit einem Donorstamm eine Alternative für das Arbeiten mit *B. licheniformis* dar.

Als Donorstamm für die Konjugation diente in dieser Arbeit *E. coli* S17-1 mit dem konjugativen Vektor pKVM1. Die Anzucht des Donorstammes erfolgte in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicilin 100 µg/ml) bei 37°C und 160 U/min über Nacht. Für die Anzucht des Rezipientenstammes *B. licheniformis* MW3 wurde ebenfalls LB-Medium, ohne Antibiotikum, verwendet und die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37°C und 160 U/min über Nacht. Der Donor- und Rezipientenstamm wurden jeweils 20fach in entsprechendem Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 bei 37°C und 160 U/min inkubiert. Um das Antibiotikum zu entfernen wurden die Zellen des Donorstammes einmal mit 50 mM Phosphatpuffer für 5 min bei 4°C und 10000 U/min gewaschen. Im Anschluss daran wurde auf das Donorpellet ein 3- bzw. 5-facher Überschuss an Rezipienten-Zellsuspension gegeben. Das Pellet wurde resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit LB-Medium wurde das Pellet in 80 µl LB-Medium resuspendiert und auf einen Konjugationsfilter (Sartorius, Order No 11306-25-N), welcher sich auf einer LB-Platte ohne Selektionsdruck befand, gegeben. Nach kurzer Antrocknung wurden die Ansätze bei 30°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellmasse mit vorgewärmten LB-Medium vom Filter geschwemmt und geeignete Verdünnungen auf LB/ Polymyxin B (40 µg/ml)/ Erythromycin (5 µg/ml) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C.

3.4.4.4. Southern-Blot

Lösungen und Puffer für den Southern-Blot

Depurinierungslösung

HCl (37%)	16,66	ml
H ₂ O	ad 800	ml

autoklavieren

Denaturierungslösung

NaCl	70,13	g
NaOH	16,0	g
H ₂ O	ad 800	ml

autoklavieren

Neutralisierungslösung (pH 7,5)

Tris	48,46	g
NaCl	140,26	g
H ₂ O	ad 800	ml

pH-Wert mit konz. HCl einstellen, autoklavieren

Transferlösung = 20 x SSC (pH 7,0)

NaCl	140,26	g
Na ₃ -citrat	70,58	g
H ₂ O	ad 800	ml

pH-Wert mit HCl einstellen, autoklavieren

10% Blocking Stammlösung

Blocking Reagent (Roche Cat. No. 1 096 176)	5	g
Maleinsäurepuffer	ad 50	ml

In der Mikrowelle kurz erhitzen, bis es beginnt aufzukochen. Anschließend autoklavieren und Lagerung in 10 ml Aliquots bei -20°C.

Maleinsäurepuffer (pH 7,5)

Maleinsäure	9,29	g
NaCl	7,01	g
NaOH	5,6	g
H ₂ O	ad 800	ml

pH-Wert mit konz. NaOH einstellen, autoklavieren

N-Laurylsarcosin-Lösung

N-Laurylsarcosin	10%	(w/v)
H ₂ O	ad 10	ml

autoklavieren

Prähybridisierungslösung = Hybridisierungslösung

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	ad 50	ml

Lösungen der Reihe nach steril vereinigen und bei 60°C lösen, anschließend bei -20°C lagern.

Puffer 1

20x SSC	80	ml
10% SDS	8	ml
H ₂ O	ad 800	ml

H₂O autoklavieren und anschließend steril vereinigen.

Puffer 2

20x SSC	4	ml
10% SDS	8	ml
H ₂ O	ad 800	ml

H₂O autoklavieren und anschließend steril vereinigen.

Puffer 3

10% Blocking Stammlösung	5	ml
Maleinsäurepuffer	45	ml

Puffer frisch ansetzen und nicht autoklavieren.

Waschpuffer

Tween 20	150	µl
Maleinsäurepuffer	ad 50	ml

Puffer frisch ansetzen und nicht autoklavieren.

Detektionspuffer (pH 9,5)

Tris	9,69	g
NaCl	4,67	g
H ₂ O	ad 800	ml

pH-Wert mit konz. HCl einstellen, autoklavieren

Detektionslösung

NBT/BCIP Stock solution (Roche, Cat. No 11 681 451 001)	100	µl
Detektionspuffer	ad 5	ml

Lösung frisch ansetzen und nicht autoklavieren.

In einem ersten Schritt wurde zunächst die Sonde für den Southern-Blot vorbereitet. Um vergleichend den Einbau des DIG darzustellen, wurde zunächst eine Test-PCR (3.7.1.) angesetzt, in welcher ein 10 mM dNTP-Mix eingesetzt wurde. In einer zweiten PCR, der Sonden-PCR (3.7.1.), wurde ein 5x DIG dNTP-Mix verwendet. Letzterer setzte sich zusammen aus 8,5 µl je 1 mM dNTP-Mix und 1,5 µl DIG DNA Labeling Mix (Roche, Cat. No. 11277 065 910). Bei der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese (1,5% und 80 V) mußte aufgrund des DIG Einbaus in das PCR Produkt eine leicht höher laufende PCR Bande der Sonden PCR zu sehen sein. Die Sonde wurde aufgereinigt (3.4.2.6.), mit 100 µl H₂O eluiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Im zweiten Schritt wurden die Proben vorbereitet. Hierzu wurde chromosomale DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen, welche eine klare Unterscheidung von Wildtyp und Konstrukten zuließen, geschnitten (3.4.3.1.). Die Überprüfung des vollständigen Verdaus erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Im Anschluss daran wurden die Ansätze inaktiviert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Beim dritten Schritt, dem so genannten Blotten, wurde zunächst 0,8%ige Agarose in eine Harnischmacher Kammer zu einem etwa 0,5 cm hohem Gel gegossen. Die Beladung des Geles erfolgte jeweils rechts und links außen mit zwei Leerspuren. Als Marker diente ein DIG-gelabelter 1kb Ladder aus GeneRuler 1 kb Ladder und DIG 1 kb-Ladder (DNA Molecular Weight Marker DIG labeled III, Roche, Cat. No 11 218 603 910) im Verhältnis 1:9. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde bei 80 V für 90 min durchgeführt. Anschließend wurde das Agarosegel in ein geeignetes Behältnis

überführt und für 10 min mit Depurinierungslösung überschichtet. Währenddessen sollte der Marker gelb werden. Nach zwei kurzen Waschschrritten mit H₂O wurde das Agarosegel zweimal für je 15 min mit Denaturierungslösung überschichtet. Der Marker wurde bei diesem Schritt wieder blau. Es folgten erneut zwei kurze Waschschrritte mit H₂O und im Anschluss daran wurde das Agarosegel zweimal für je 15 min mit Neutralisierungslösung überschichtet. Nach einem abschließenden Waschschrtritt mit H₂O wurde das Agarosegel in eine bereits vorbereitete Blot-Apparatur (Bio-Rad Vacuum Blotter Model 785) überführt. Zur Vorbereitung des Aufbaus wurde die Nylonmembran (Roche, Cat. No 11 417 240 001) und Whatman-Papier 1 cm breiter und länger als die verwendete Maske zugeschnitten, mit H₂O angefeuchtet und die Blot-Apparatur laut Anweisung des Herstellers zusammengesetzt. Der DNA-Transfer erfolgte bei 7 Hg für 45 min. Das Fixieren der DNA auf die noch feuchte Membran wurde in einem Transilluminator für 2 min mit der DNA-Seite nach unten bei 302 nm durchgeführt.

Für den vierten Schritt, der Hybridisierung, wurde die getrocknete Membran anschließend luftblasenfrei mit der DNA-Seite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und mit Prähybridisierungslösung (20 ml/ 100 cm²) bei 68°C für 90 min in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Parallel hierzu wurde die Sonde für 5 min bei 98°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gelagert. Zur eigentlichen Hybridisierung, welche für 16 Stunden bei 68°C erfolgte, wurde die Sonde direkt in die Prähybridisierungslösung im Hybridisierungsröhrchen gegeben. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung zum Waschen der Membran durch 50 ml Puffer 1 ersetzt und zweimal für je 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser wurde wiederum durch 50 ml auf 68°C vorgewärmten Puffer 2 ersetzt und es folgte eine Inkubation für zweimal 20 min bei 68°C.

Zur Detektion, dem fünften Schritt, wurde die Membran in ein geeignetes, zu schwenkendes Behältnis überführt, mit 50 ml Puffer 3 überschichtet und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel hierzu wurden Anti Digoxigenin-AP Fab Fragmente (Roche, Cat. No 11 093 274 910) für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert und 5 µl des Überstandes direkt zum Puffer 3 gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Zum Entfernen des ungebundenen Antikörpers wurde die Membran zweimal für je 20 min mit 50 ml Waschpuffer überschichtet. Nach einer 5 minütigen Inkubation mit 50 ml Detektionspuffer wurde die Membran in Folie

eingeschweißt und unter Zugabe der Detektionslösung (5 ml/ 100 cm²) lichtgeschützt für 30 min bzw. bis eine deutliche Farbreaktion zu erkennen war inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch waschen mit H₂O. Die Membran wurde anschließend getrocknet und mit dem Transilluminator (GE Healthcare ImageQuant™ 400) dokumentiert.

3.5. Erstellung von *clean deletion* - Mutanten

Zur Erstellung dieser Mutanten sollte das Zielgen durch ein stark verkürztes Fragment des gleichen Gens in *B. licheniformis* mittels homologer Rekombination ausgetauscht und somit inaktiviert werden. Zunächst wurde mittels GeneSOEing (gene splicing by overlap extension, nach Horton et al., 1989) ein Deletionskonstrukt erzeugt. Hierzu wurden mittels getrennten PCR-Reaktionen (3.7.2.) zwei Flanken A und B erzeugt, welche den zu deletierenden Bereich des Gens umgeben. Die verwendeten Primer waren dabei so konstruiert, dass die jeweils äußeren Primer Restriktionsschnittstellen besaßen und die jeweils inneren Primer Extensions, welche revers komplementär zueinander waren. In einer weiteren PCR fusionierten diese Extensions miteinander und das daraus entstandene Produkt wurde ausgehend von den äußeren Primern amplifiziert (3.7.2.). Nach der Aufreinigung des Deletionskonstruktes (3.4.2.6.) wurde dieses mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (3.4.3.1.). Mit dem entsprechend geschnittenen Vektor wurde das Konstrukt im Anschluss ligiert (3.4.3.3.). Sollte der DNA-Transfer mittels Protoplasten-Transformation (3.4.4.2.) erfolgen, wurde der Vektor pMAD für die Ligation gewählt. Für den DNA-Transfer mittels Konjugation (3.4.4.3.) wurde der Vektor pKVM1 verwendet. Obiger Ligationsansatz wurde anschließend in *E. coli* transformiert (3.4.4.1.). Um zu überprüfen, ob die Transformanten den Vektor mit Deletionskonstrukt aufgenommen hatten, wurden diese entweder mittels Kolonie-PCR (3.7.3.) mit plasmidspezifischen Primern oder durch die Eckhardt-Lyse (3.4.2.8.) überprüft. Aus geeigneten Transformanten wurde im weiteren das Deletionskonstrukt isoliert (3.4.2.5.) und in die Protoplasten-Transformation eingesetzt, oder sie dienten direkt als Donor für die Konjugation mit *B. licheniformis* MW3.

Sowohl der zur Protoplasten-Transformation verwendete Vektor pMAD, als auch der konjugative Vektor pKVM1 besitzen einen temperatursensitiven Replikationsursprung

(oriR pE194^{ts}, Villafane et. al., 1987). Dieser ermöglicht bei einer Temperatur von 30°C, nicht aber bei einer Temperatur von 37°C oder darüber eine stabile Replikation. Um das 1. Rekombinationsereignis über homologe Bereiche des Zielgens einzuleiten wurden Kolonien, welche man aus der Protoplasten-Transformation bzw. Konjugation erhalten hatte, bei nicht-permissiver Temperatur (42°C) in Erythromycin-haltigem Medium (5 µg/ml) kultiviert. Die Selektion der Integrianten erfolgte anschließend mit geeigneten Verdünnungen mittels Blau-Weiß-Screening auf X-Gal-haltigen Selektivplatten (NB/ 50 mM Glucose/ 5 µg/ml Erythromycin). Die verwendeten Vektoren enthalten das Gen *bgaB*, welches für eine β-Galaktosidase kodiert. Diese wird konstitutiv über den starken Promoter P_{clpB} exprimiert und bewirkt eine Blaufärbung der Integrianten-Kolonien durch die Spaltung des chromogenen Substrates X-Gal. Um die chromosomale β-Galaktosidase von *B. licheniformis* zu reprimieren wurde dem Medium 50 mM Glucose zugesetzt. Aus geeigneten Kolonien wurde mittels Schnellpräparation (3.4.2.4.) DNA extrahiert, welche als Template für eine PCR-Reaktion zum Nachweis des integrierten Plasmids diente. Dieser Nachweis erfolgte dabei mit einem plasmidspezifischen Primer und einem Primer, welcher außerhalb des zu deletierenden Genes im Genom bindet. Durch anschließendes Wachstum bei permissiver Temperatur (30°C) wurde das 2. Rekombinationsereignis eingeleitet und das Plasmid ging nach mehreren Passagen in Medium ohne Selektionsdruck verloren. Hierbei konnte entweder das chromosomale Wildtypgen oder aber das Deletionskonstrukt mit dem Plasmid herausgeschnitten werden (Arnaud et al., 2004). Durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen auf X-Gal-haltigem Medium konnten Kolonien identifiziert werden, bei denen das 2. Rekombinationsereignis stattgefunden hatte. Diese erschienen aufgrund des Verlustes des Plasmids mit der konstitutiv exprimierten β-Galaktosidase weiß. Wiederum wurde aus geeigneten Kolonien DNA extrahiert (3.4.2.1.), welche als Template für eine PCR-Reaktion zum Nachweis der Deletion diente. Erreicht wurde dieses durch die Verwendung von Primern, welche außerhalb des zu deletierenden Bereichs im Genom binden. Dadurch konnte aufgrund der Größe des erhaltenen PCR-Produktes zwischen potentieller Mutante und Wildtyp unterschieden werden. Mit den gleichen Primern wurde die Deletion durch Sequenzierung überprüft. Mittels Southern-Blot wurde der Verlust des Plasmids überprüft.

3.6. Techniken für das Arbeiten mit RNA

3.6.1. Lösungen und Puffer zum Arbeiten mit RNA

Der Umgang mit RNA erfordert äußerst sauberes Arbeiten, um eine Kontamination mit den sehr stabilen RNasen zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden alle thermostabilen Lösungen, Glaswaren, Pipettenspitzen und andere Materialien, die für das Arbeiten mit RNA notwendig waren, 2x bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Die Arbeiten wurden ausschließlich mit Handschuhen durchgeführt. Der Arbeitsplatz und sämtliche notwendigen Gerätschaften wie z.B. Pipetten wurden wiederholt mit 70%igem Ethanol (v/v) gesäubert.

5x DNase Puffer

MgSO ₄	25	mM
Na-Acetat, pH 5,0	500	mM
2x autoklaviert		

10x MOPS-Puffer (pH 7,0)

MOPS	200	mM
Na-Acetat	50	mM
EDTA	10	mM
pH-Wert mit NaOH einstellen		

RNA-Auftragspuffer

Formamid	6,5	ml
Formaldehyd	1,2	ml
10x MOPS	2,0	ml
50% Saccharose	0,4	ml
Bromphenolblau	20	mg
Xylencyanol	20	mg
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	5	µl

TE-Puffer (pH 8,0)

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

2x autoklaviert

3.6.2. Isolierung von RNA aus *B. licheniformis*

Für die Isolierung von RNA aus Zellen von *B. licheniformis* ist ein enzymatischer Zellaufschluss ungeeignet. Die Inkubationszeiten und –temperaturen hätten einen vorzeitigen Abbau der RNA zur Folge, da RNA eine kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten aufweist. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit dem Dismembrator im tiefgekühlten Zustand aufgeschlossen (vgl. 3.4.2.1.).

Um RNA aus *B. licheniformis*-Zellen zu isolieren, wurden Aliquots von 40 ml aus dem Kulturgefäß entnommen, mit jeweils 10 ml vorgekühltem Methanol versetzt und zügig bei –20°C geerntet (9000 U/min, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bei -70°C gelagert.

Zum Zellaufschluß wurden die Pellets der 40 ml Aliquots in 1 ml sterilem TE-Puffer resuspendiert und bei –9°C gewaschen (13000 U/min, 2 min). Im Anschluss daran wurde das Pellet in 200 µl sterilem TE-Puffer resuspendiert. Parallel wurde das Teflongefäß mit der Chromstahlkugel des Dismembrators in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die resuspendierten Zellen wurden in den etwas flüssigen Stickstoff und die Chromstahlkugel enthaltenden PTFE-Zylinder pipettiert, das Gefäß verschlossen und in die Zelmühle eingespannt. Während des Aufschlusses bei 1600 U/min für 3 min wurden die Zellen zu einem weißen gekühlten Zellpulver zermahlen. Dieses wurde vorsichtig in 4 ml RLT-Puffer des RNeasy® Midi Kits (Qiagen, Cat no. 75144), welchem zuvor 40 µl Mercaptoethanol zugesetzt wurden, resuspendiert. Dieser Puffer wirkt aufgrund einer hohen Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration stark proteindenaturierend, so dass die gelösten Zellbestandteile bei 4°C über Nacht bis zur weiteren Präparation aufbewahrt werden konnten.

Die weitere Isolierung und Reinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Midi Kits nach Anleitung des Herstellers. Für die Eluation der RNA wurden 2 x 150 µl RNase freies und steriles H₂O verwendet. Die RNA konnte bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

3.6.3. DNase-Verdau und Kontrolle der RNA

Um Verunreinigungen der RNA mit Resten chromosomaler DNA zu vermeiden, erfolgte eine Behandlung der RNA-Lösung mit DNase. Dazu wurden zu den maximal 300 µl wässriger RNA-Lösung, hervorgegangen aus der RNA Isolation, 65 µl 5x DNase-Puffer und 15 µl DNase (10 U/µl, Roche, REF 04716728001) gegeben. Während einer Inkubation des Ansatzes für 90 min bei 25°C wurde verbliebene DNA durch die DNase hydrolysiert. Im folgenden Inkubationsschritt von 10 min bei 70°C im Thermoblock wurde die DNase inaktiviert. Um sicher zu gehen, dass sämtliche DNA abgebaut wurde, erfolgte eine PCR (3.7.4.) mit spezifischen Primern. Chromosomale DNA wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die PCR-Ansätze wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei lediglich bei der Positivkontrolle ein Amplifikationsprodukt erscheinen durfte. Im anderen Falle musste die DNase-Behandlung wiederholt werden.

3.6.4. Extraktion und Fällung von RNA

Extraktion von RNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Die meisten Nukleinsäurepräparationen enthalten unerwünschte Protein-kontaminationen. Diese können mit einer Form der Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt werden. Hierzu wurde der RNA 1 Vol saures Phenol zugegeben. Der Ansatz wurde 10 sec gevortext und 3 min bei 13000 U/min zentrifugiert. In diesem Schritt erfolgte eine Phasentrennung. Die obere, wässrige Phase enthielt die gelöste RNA, die denaturierten Proteine hingegen befanden sich in der Interphase. Die obere Phase wurde, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die abgenommene RNA-haltige Phase wurde anschließend mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24/1 v/v) versetzt, ebenfalls 10 sec gevortext, 3 min bei 13000 U/min zentrifugiert und die entstandene obere Phase erneut in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA aufzukonzentrieren erfolgte als nächstes eine Fällung mit Ethanol.

Fällung der RNA mit Ethanol

Die in H₂O gelöste RNA wurde mit 1/10 Vol Na-Acetat (3,3 M, pH 5,0) und 2,5 Vol -20°C kaltem, unvergällten Ethanol (96%) versetzt und gemischt. Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht oder 2 Stunden bei -70°C. Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 min bei 13000 U/min und -9°C wurde der Ethanol vorsichtig mit der Pipette abgenommen, ohne das transparente RNA-Pellet zu verletzen. Mit 1 ml -20°C kaltem 70%igen Ethanol (v/v) wurde das Pellet für 15 min bei 13000 U/min und -9°C gewaschen und der Ethanol erneut vorsichtig abgenommen. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem RNA-Pellet wurde offen in einem mit Aluminiumfolie verschlossenem, zuvor zweimal autoklaviertem, Becherglas bei 37°C für ca. 15 min getrocknet, bis der Ethanol verdampft war. Gelöst wurde das Pellet in 15 µl RNase freiem H₂O 2 Stunden auf Eis. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C.

3.6.5. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von RNA erfolgte analog der Konzentrationsbestimmung von DNA (3.4.2.10.). Eine OD₂₆₀ von 1 entsprach einer Konzentration von 40 µg/ml RNA (Sambrook et al., 1989).

3.6.6. Qualitätskontrolle der RNA

3.6.6.1. Elektrophorese von RNA

Für die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurden denaturierende Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurden zunächst 1 g Agarose in 72 ml H₂O aufgekocht. Nach Abkühlen auf 60°C wurden unter dem Abzug 10 ml 10x MOPS-Puffer sowie 18 ml Formaldehyd zugegeben und gut gemischt. Die Lösung wurde anschließend in einen abgegrenzten Bereich einer Gellaufkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit 1x MOPS-Puffer überschichtet und der Taschenkamm entfernt. Zur Probenvorbereitung wurde das 1 µg RNA entsprechende Volumen mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt, anschließend mit 1 Vol RNA-Auftragspuffer gemischt und für 15 min bei 65°C im Heizblock denaturiert. Nach einer

Inkubation der Proben für 1 - 2 min auf Eiswasser wurde das Gel zügig beladen. Zur Bestimmung der Transkriptgröße wurde ein identisch behandelter DIG-markierter RNA-Größenstandard (RNA Molecular Weight Marker I, DIG-labeled, Roche 1 526 529) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V (Regel: ~ 5 V / cm Elektrodenabstand) für ca. 2 Stunden, bis die vordere Bande $\frac{3}{4}$ der Gellänge durchlaufen hatte. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

3.6.6.2. Bioanalyser

Eine weitere Möglichkeit der Auftrennung von RNA stellt der Agilent 2100 Bioanalyser dar. Die verwendeten RNA Chips des RNA 6000 Nano Kits (Agilent, Cat. No 5067-1511) wurden nach Anweisung des Herstellers präpariert und beladen. Als Matrix diente hierbei ein Gel-Farbstoff-Gemisch. Während der Analyse wandern die Proben aus den beladenen Wells in den Separationskanal des RNA-Chips und werden dort elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die Komponenten über ihre Fluoreszenz detektiert und in ein gelähnliches Bild und ein Elektropherogramm umgewandelt.

3.6.6.3. Kontrolle der RNA-Integrität

Die Qualität der RNA wurde mittels 'Reverser Transkription' (3.7.5.), wie bei der Kontrolle der RNA (3.6.3.), mit spezifischen Primern überprüft. Auch hier erfolgte anschließend eine Auftrennung der Ansätze durch Agarose-Gelelektrophorese, wobei hier für jeden RNA enthaltenden Ansatz ein Amplifikationsprodukt zu sehen sein musste.

3.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient als *in vitro*-Methode, welche es ermöglicht spezifische DNA-Fragmente aus einem komplexen DNA-Gemisch enzymatisch zu amplifizieren. Dafür sind Matrizen-DNA (Template), ein Oligonukleotid-Primerpaar, dNTP's, sowie eine thermostabile DNA-Polymerase mit zugehörigem Puffer

notwendig. Im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in einzelsträngige DNA überführt. Durch Absenken der Temperatur können sich im zweiten Schritt, dem Annealing, zwei Oligonukleotid-Primer an die Matrizen-DNA anlagern. Die Oligonukleotid-Primer wurden so ausgewählt, dass sie die zu amplifizierende Region flankieren. Bei der Elongation, dem dritten Schritt der PCR, werden die beiden Primer mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase komplementär zur ursprünglichen doppelsträngigen DNA verlängert. Es wird zur Amplifikation eine bestimmte Anzahl an Zyklen durchgeführt, wodurch die von den Primern flankierte Region exponentiell akkumuliert wird.

In dieser Arbeit wurde die PCR zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt, neben der Herstellung von Sonden für den Southern-Blot, auch zur Herstellung von Deletionskonstrukten und zur Überprüfung einzelner Zwischenschritte der Erstellung von *clean deletion* - Mutanten. Außerdem erfolgte mittels PCR die Überprüfung auf DNA-Reste, ebenso wie die Überprüfung von RNA mittels vorangegangener 'Reverser Transkription' und sie wurde zur Expressionsanalyse mittels *real-time* RT-PCR eingesetzt. Als Primer wurden, wenn nicht anders erwähnt, Oligonukleotide zwischen 20 bp und 22 bp und einer Schmelztemperatur zwischen 55°C und 60°C verwendet. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch überprüft.

3.7.1. PCRs für den Southern-Blot

Diese PCRs dienten der Vorbereitung und Generierung der Sonden für den Southern-Blot. Es wurden Fragmente mit einer erwarteten Größe von bis zu 750 bp amplifiziert. Verwendet wurde die Hot Start Phire™ DNA-Polymerase der Firma Finnzymes.

50 µl Test-PCR-Ansatz:

1	µl	chromosomale DNA	(100 ng/µl)
2,5	µl	Primer A	(10 µM)
2,5	µl	Primer B	(10 µM)
1	µl	dNTP-Mix	(10 mM)
10	µl	5x Phire-Puffer	
1	µl	Phire DNA-Polymerase	
32	µl	H ₂ O	

50 µl Sonden-PCR-Ansatz:

1	µl	chromosomale DNA	(100 ng/µl)
2,5	µl	Primer A	(10 µM)
2,5	µl	Primer B	(10 µM)
10	µl	5x DIG dNTP-Mix	
10	µl	5x Phire-Puffer	
1	µl	Phire DNA-Polymerase	
23	µl	H ₂ O	

PCR-Programm:

LID = 110°C

1	T = 98°C	00:03:00
2	T = 98°C	00:00:10
3	T = 57°C	00:00:10
4	T = 72°C	00:00:40
5	GOTO 2 REPEAT 29x	
6	T = 72°C	00:01:00
7	T = 8°C	FOREVER

3.7.2. GeneSOEing-PCRs

Mit den folgenden PCRs wurden Deletionskonstrukte im Rahmen der Erstellung von *clean deletion* – Mutanten erzeugt. Es wurden Fragmente mit einer erwarteten Größe zwischen 700 bp und 1700 bp amplifiziert. Eingesetzt wurde die Hot Start Phire™ DNA-Polymerase der Firma Finnzymes.

Erstellung der Flanken

50 µl Ansatz:

1	µl	chromosomale DNA	(250 ng/µl)
2,5	µl	Forward Primer Flanke A bzw. B	(10 µM)
2,5	µl	Reverse Primer Flanke A bzw. B	(10 µM)
1	µl	dNTP-Mix	(10 mM)
10	µl	5x Phire-Puffer	
1	µl	Phire DNA-Polymerase	
32	µl	H ₂ O	

Fusion der Flanken

50 µl Ansatz:

1	µl	Flanke A	
1	µl	Flanke B	
2,5	µl	Forward Primer Flanke A	(10 µM)
2,5	µl	Reverse Primer Flanke B	(10 µM)
1	µl	dNTP-Mix	(10 mM)
10	µl	5x Phire-Puffer	
1	µl	Phire DNA-Polymerase	
31	µl	H ₂ O	

PCR-Programm:

LID = 110°C

1	T = 98°C	00:03:00
2	T = 98°C	00:00:10
3	T = 57°C	00:00:10
4	T = 72°C	00:00:40
5	GOTO 2 REPEAT 29x	
6	T = 72°C	00:01:00
7	T = 8°C	FOREVER

3.7.3. Kolonie-PCR

Zur Überprüfung von Transformaten im Rahmen der Erstellung von *clean deletion* - Mutanten wurden mit dieser PCR Fragmente mit einer erwarteten Größe von maximal 2000 bp amplifiziert. Anstelle der chromosomalen DNA wurde Koloniematerial eingesetzt und in 9,5 µl H₂O resuspendiert. Die Lyse der Zellen fand durch eine verlängerte Vorabdenaturierung statt. Als Template für die mitgeführte Positivkontrolle diente Plasmid-DNA. Verwendet wurde die Taq DNA-Polymerase der Firma Qiagen.

20 µl Ansatz:

4	µl	Primer A	(5 µM)
4	µl	Primer B	(5 µM)
0,4	µl	dNTP-Mix	(10 mM)
2	µl	10x S-Puffer	
0,1	µl	Taq DNA-Polymerase	(5 U/µl)
9,5	µl	H ₂ O	

Programm:

LID = 110°C

1	T = 98°C	00:08:00
2	T = 96°C	00:00:30
3	T = 59°C	00:00:30
4	T = 72°C	00:02:30
5	GOTO 2 REPEAT 24x	
6	T = 72°C	00:10:00
7	T = 8°C	FOREVER

3.7.4. PCR zur Überprüfung auf DNA-Reste

Diese PCR wurde für die Amplifikation von Fragmenten mit einer erwarteten Größe zwischen 500 bp und maximal 1000 bp verwendet. Eingesetzt wurde die Taq DNA-Polymerase der Firma Qiagen.

20 µl Ansatz:

1	µl	chromosomale DNA	(500 ng/µl)
4	µl	Primer A	(5 µM)
4	µl	Primer B	(5 µM)
0,4	µl	dNTP-Mix	(10 mM)
2	µl	10x S-Puffer	
0,1	µl	Taq DNA-Polymerase	(5 U/µl)
8,5	µl	H ₂ O (RNase frei)	

Programm:

LID = 110°C

1	T = 96°C	00:02:00
2	T = 96°C	00:00:30
3	T = 59°C	00:00:30
4	T = 72°C	00:01:30
5	GOTO 2 REPEAT 24x	
6	T = 72°C	00:10:00
7	T = 8°C	FOREVER

3.7.5. Reverse Transkriptions-PCR

Bei einer Reversen Transkriptions-PCR wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben, welche anschließend mittels PCR amplifiziert werden kann. Die reverse Transkription und die anschließende PCR konnten mit dem in dieser Arbeit verwendeten QIAGEN[®] OneStep RT-PCR Kit (Cat no. 210210) in einem Schritt durchgeführt werden.

25 µl Ansatz:

500	ng	Template RNA	
4	µl	Primer A	(5 µM)
4	µl	Primer B	(5 µM)
1	µl	dNTP-Mix	(10 mM)
5	µl	5x 'OneStep RT-PCR Puffer'	
1	µl	'OneStep RT-PCR Enzyme Mix'	
ad 25µl		H ₂ O (RNase frei)	

Programm:

LID = 110°C

1	T = 50°C	00:30:00
2	T = 96°C	00:15:00
3	T = 96°C	00:00:30
4	T = 59°C	00:00:30
5	T = 72°C	00:02:00
6	GOTO 3 REPEAT 24x	
7	T = 72°C	00:10:00
8	T = 8°C	FOREVER

3.7.6. Quantitative *real-time* RT-PCR

Die quantitative *real-time* RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren und damit zur Expressionsanalyse einzelner Gene geeignet. Sie diente in dieser Arbeit zur Verifizierung der DNA-Microarray Ergebnisse. Ein entscheidendes Werkzeug der *real-time* RT-PCR sind unterschiedliche Farbstoffe oder Fluorophore, über deren Signal nach Bindung an die DNA die Kinetik der Polynukleotidsynthese per PCR 'in Echtzeit' beobachtet werden kann. Die Markierung der DNA kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: nach dem TaqMan Prinzip, mit *molecular beacons*, *hybridization probes* oder unter Einsatz eines Farbstoffes wie z.B. SYBR™ Green. Der entscheidende Vorteil von SYBR™ Green liegt darin, dass dieser Farbstoff unspezifisch in doppelsträngige DNA eingebaut wird, wohingegen für die anderen genannten Markierungsmöglichkeiten die Synthese spezifischer Sonden notwendig ist. Aus diesem

Grund wurde in dieser Arbeit SYBR™ Green verwendet.

Bei der quantitativen *real-time* RT-PCR wird über das Fluoreszenzsignal indirekt die Zunahme des PCR-Produktes gemessen. Zunächst findet in einer PCR-Reaktion eine annähernd exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Limitierende Faktoren wie z.B. die Abnahme der dNTP-Konzentration, verminderte Enzymaktivität und / oder die Anhäufung von Pyrophosphat verlangsamen jedoch die Produktbildung in der späten Phase der PCR-Reaktion. Die Quantifizierung bei der *real-time* RT-PCR erfolgt über den so genannten Ct-Wert, hierbei handelt es sich um die Zykluszahl, bei welcher sich das Fluoreszenzsignal einer Probe das erste Mal signifikant vom Hintergrund abhebt. Anhand einer Standardkurve können definierten Templatemengen Ct-Werte zugewiesen werden. Beim Vergleich zweier Versuchsbedingungen hinsichtlich der Expression eines ausgewählten Gens war eine solche Bestimmung der absoluten Templatemenge über eine Eichgerade nicht erforderlich. Nach folgender Formel kann allein über die Ct-Werte eines ausgewählten Gens unter beiden Versuchsbedingungen im Vergleich zu den Ct-Werten eines konstitutiven Gens, ebenfalls unter beiden Versuchsbedingungen, der Regulationsfaktor ermittelt werden:

$$\text{Regulationsfaktor} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\text{mit } \Delta\Delta\text{Ct für Gen x} = (\text{Ct}_x - \text{Ct}_{\text{konstitutiv}})_{\text{Bedingung I}} - (\text{Ct}_x - \text{Ct}_{\text{konstitutiv}})_{\text{Bedingung II}}$$

(Talaat et al., 2002)

Die Primer der ausgewählten Gene wurden mit einer Länge von 20-23 bp und einer Schmelztemperatur von etwa 60°C generiert und so gewählt, dass die Länge des erwarteten PCR-Produktes bei ca. 150 bp liegt. Sämtliche Arbeiten wurden unter RNase freien Bedingungen durchgeführt. In dieser Arbeit wurden der QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Master Mix (Qiagen, Hilden) und das 'iCycler iQ™ *real-time* PCR Detection System' der Firma Bio-Rad verwendet. Für den Ansatz der *real-time* RT-PCR wurde zuerst ein Mastermix aus dem QuantiTect Mastermix und dem Enzymmix für alle Proben hergestellt, welcher dann auf die zu testenden RNAs aufgeteilt wurde (Premix). Die Primer wurden in 96 well PCR Platten (Bio-Rad, iCycler iQ™ PCR Plates, Cat. No 2239441, PCR Tube Strips™ Flat Cap Strips, Cat. No TCS0803) vorgelegt und 20 µl Premix zugegeben. Auf diese Weise wurden mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit alle Reaktionskomponenten gleichmäßig auf die

einzelnen Ansätze verteilt.

25 µl Ansatz:

400	ng	RNA
2,5	µl	Primer A 5 µM
2,5	µl	Primer B 5 µM
12,5	µl	'QuantiTect Mastermix'
0,5	µl	Enzymmix
ad 25	µl	H ₂ O (RNase frei)

I-Cycler Programm:

Cycle 1:	(1x)			
	Step 1:	50.0°C	30 min	(Reverse Transkription)
Cycle 2:	(1x)			
	Step 1:	95.0°C	15 min	(Aktivierung der DNA-Polymerase)
Cycle 3:	(45 x)			
	Step 1:	94.0°C	15 sec	(PCR)
	Step 2:	57.0°C	30 sec	
	Step 3:	72.0°C	30 sec	
Cycle 4:	(1x)			
	Step 1:	55.0°C	1 min	(Abschließende Elongation)
Cycle 5:	(80 x)			
	Step 1:	55.0°C	10 sec	(Ermittlung des Schmelzpunktes
		+0.5°C		der PCR-Produkte)
Cycle 6:	(1x)			
	Step 1:	4.0°C	HOLD	

3.8. Hybridisierung und Auswertung von Microarrays

Die Genexpressionsanalyse dient der Untersuchung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung zellulärer mRNA, wofür typischerweise die relativen Expressionsstärken zweier Proben miteinander verglichen werden. Bei diesen Proben

handelt es sich um RNA, welche aus Zellen gewonnen wird, die zum einen unter Standard- oder Referenzbedingungen und zum anderen unter den experimentell zu untersuchenden Bedingungen gewachsen sind.

Die für die Hybridisierung verwendete RNA (*targets*) wird mit den fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen CyTM3 und CyTM5 (GE Healthcare, CyTM3-dctp, Cat no. PA53021, CyTM5-dctp, Cat no. PA55021) markiert. Die jeweils korrespondierenden Fluoreszenzsignale der beiden Farbstoffe können nach der Hybridisierung der *probes* mit den *targets* unabhängig voneinander mit dem GenePix 4000B (AXON Instruments, Union City, USA) Scanner detektiert werden. Als *probes* werden in diesem Zusammenhang die immobilisierten Nukleinsäuresequenzen auf der Oberfläche des DNA-Microarrays bezeichnet. Die Verwendung von Fluoreszenz ermöglicht, im Vergleich zu einer radioaktiven Markierung, neben höherer Sensitivität und Auflösung, das Auswerten von zwei oder mehreren verschiedenen Signalen in einem Experiment. Im Anschluss an eine Normalisierung der Daten kann die Intensität der Hybridisierungssignale miteinander verglichen werden. DNA-Microarrays geben keine Information über die absoluten Expressionsstärken in den untersuchten Proben, da die Fluoreszenzsignale auch von der Anzahl eingebauter Farbstoffmoleküle abhängt, der Markierungsdichte. Letztere wird in erster Linie durch die variable Nukleotidsequenz der Gene bestimmt.

Für die Transkriptionsanalysen standen verschiedene DNA-Microarrays zur Verfügung. Als *probes* dienten zum einen PCR amplifizierte Fragmente, zum anderen Oligonukleotide. Einher gingen damit unterschiedliche Protokolle im Zusammenhang mit der Markierung von RNA und der Hybridisierung von cDNA.

3.8.1. Markierung von RNA mit CyTM3/CyTM5 Fluoreszenzfarbstoff

Markierung von RNA mit CyTM3/CyTM5 Fluoreszenzfarbstoff für PCR-basierende DNA-Microarrays

Die Markierung der isolierten RNA (3.6.2.) erfolgte über eine reverse Transkription mit *random nonamers* als Primer. Für die Hybridisierung der als Kontrolle verwendeten *ScoreCard*TM wurde in Form eines *spike mix* spezifische RNA (*Lucedia*TM *Universal ScoreCard*TM, Amersham Biosciences) für beide Farbreaktionen mitgeführt. Während

des Umschreibens der RNA werden CyDye markierte dCTPs in die cDNA eingebaut. Die restlichen dNTPs werden ohne eine Markierung als dCTP Nukleotid Mix zugegeben. Es kam hierbei der Cyscribe First Strand cDNA Labeling Kit (Amersham Biosciences) zum Einsatz.

Als erster Schritt des Markierens erfolgte das Annealing der *random nonamers* an die RNA, wofür 25 µg RNA benötigt wurden. Aufgrund unterschiedlicher Markierungseffizienz der Farbstoffe wurden für eine Hybridisierungsreaktion ein Ansatz CyTM3 und zwei Ansätze CyTM5 markiert. Es ist zu bemerken, dass die Cyanin-Farbstoffe stark lichtempfindlich sind und daher die Reaktionsansätze der Markierung, sowie die markierten Proben möglichst lichtgeschützt behandelt wurden. Das Annealing fand im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg) statt:

Annealing-Ansatz:

25 µg isolierte RNA
1 µl *spike mix* für CyTM3 oder CyTM5 Reaktion
1 µl *random nonamers*
ad 11µl H₂O

Annealing-Programm:

LIDHT = 110°C

1	HOLD	5 min	70°C
2	TEMP GRADIENT	3,0°C/min	to 50°C
3	TEMP GRADIENT	1,0°C/min	to 40°C
4	TEMP GRADIENT	0,3°C/min	to 35°C
5	TEMP GRADIENT	0,2°C/min	to 30°C
6	TEMP GRADIENT	0,1°C/min	to 25°C
7	TEMP GRADIENT	0,1°C/min	to 22°C
8	HOLD	20 min	22°C
9	TEMP	FOREVER	4°C

Im Anschluss wurden dem Annealing-Ansatz folgende Komponenten für die reverse Transkription hinzugefügt:

Ansatz für die reverse Transkription:

11	µl	Annealing Ansatz
4	µl	5x 'CyScript Puffer'
2	µl	0,1 M DTT
1	µl	'dCTP Nukleotid Mix'
1	µl	dCTP CyDye-markierte Nukleotide (Cy TM 3-dCTP oder Cy TM 5-dCTP)
1	µl	CyScript Reverse Transkriptase (100 U/µl)

Die 20 µl Reaktionsansätze wurden kurz gemischt, abzentrifugiert und 1,5 h bei 42°C im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf inkubiert. Um die Template RNA und nicht eingebaute CyDye Nukleotide zu entfernen, erfolgte anschließend eine zügige Aufreinigung der markierten cDNA. Zunächst wurde die RNA durch Zugabe von 2 µl 2,5 M NaOH in kurze Oligomere hydrolysiert. Die Ansätze wurden 10 sec gevortext, kurz abzentrifugiert und 15 min bei 37°C für die Hydrolyse im Mastercycler Gradient inkubiert. Um die Lösung zu neutralisieren wurden im Anschluss 10 µl 2 M HEPES hinzugegeben, 10 sec gevortext und wiederholt zentrifugiert. Im Anschluss daran folgte eine Aufreinigung der markierten cDNA (3.8.2.) über eine Säule des illustraTM CyScribeTM GFXTM Purification Kits (GE Healthcare, Cat no. 27-9606-02).

Markierung von RNA mit CyTM3/CyTM5 Fluoreszenzfarbstoff für Oligo-basierende DNA-Microarrays

Anders als bei den PCR-basierenden DNA-Microarrays erfolgte die Markierung der isolierten RNA (3.6.2.) über eine reverse Transkription mit *random hexamers* (Primer random p(dN)₆ Roche, REF 11034731001) als Primer. Des weiteren wurde für den Ansatz der reversen Transkription ein 4/10 dNTP Nukleotid-Mix verwendet, welcher 4 mM dCTP und jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP enthielt. Außer den verwendeten Cyanin-Farbstoffen lagen die weiteren Komponenten des Ansatzes der reversen Transkription der verwendeten SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat no. 18080-044) bei.

Zunächst erfolgte als erster Schritt des Markierens das Annealing der *random hexamers* an die RNA, von welcher 50 µg eingesetzt wurde. Wie bei den PCR-basierenden DNA-Microarrays wurden für eine Hybridisierungsreaktion ein Ansatz CyTM3 und zwei

Ansätze CyTM5 markiert. Das Annealing hingegen fand für 10 min bei 70°C im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg) statt:

Annealing-Ansatz:

50 µg isolierte RNA
4 µl *random hexamers* (5 µg/µl)
ad 10 µl H₂O

Anschließend wurden dem Annealing-Ansatz für die reverse Transkription die folgenden Komponenten der Reihe nach zugeben:

Ansatz für die reverse Transkription:

10 µl Annealing Ansatz
4 µl 5x 'first strand Puffer'
2 µl 0,1 M DTT
2 µl '4/10 dNTP Nukleotid-Mix'
1 µl dCTP CyDye-markierte Nukleotide (CyTM3-dCTP oder CyTM5-dCTP)
1 µl SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (200 U/µl)

Die Reaktionsansätze wurden nach kurzem Mischen abzentrifugiert und 3 Stunden bei 42°C im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf inkubiert. Die weitere Durchführung entsprach der zur Markierung von RNA für PCR-basierende DNA-Microarrays, mit dem Unterschied, dass für Aufreinigung der markierten cDNA (3.8.2.) mit dem illustraTM CyScribeTM GFXTM Purification Kit je Cyanin-Farbstoff eine Säule verwendet wurde. Aus diesem Grund erfolgte die Elution der cDNA mit 30 µl 70°C warmen Elutionspuffer.

3.8.2. Aufreinigung der markierten cDNA

Die Aufreinigung der markierten cDNA erfolgte mit dem illustraTM CyScribeTM GFXTM Purification Kit. Zunächst wurden hierzu 500 µl *Capture Buffer* auf die Säule pipettiert, die Markierungsansätze hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Cyanin-Farbstoffe wurden die folgenden

Schritte möglichst lichtgeschützt durchgeführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 sec bei 13000 U/min, wobei die cDNA an die Säulenmatrix bindet. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen und nach der Zugabe von 600 µl Waschpuffer wieder für 30 sec bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und der Waschschrift weitere zweimal wiederholt. Danach erfolgte die Eluation der markierten *target* cDNA in ein neues Reaktionsgefäß, indem 70 µl 70°C warmer Eluationspuffer auf die Säule gegeben, für 5 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert wurde. Das markierte cDNA enthaltende Eluat konnte bis zur Hybridisierung lichtgeschützt auf Eis gelagert werden.

3.8.3. Überprüfung der Markierungsreaktion

Um die Effizienz der Markierungsreaktion bewerten zu können, wurde ein *Wavelength scan* mit der markierten cDNA durchgeführt. Die Absorbptionsmaxima von eingebautem CyTM3/CyTM5 liegen bei 550/650 nm, von freiem CyTM3/CyTM5 bei ca. 520/600 nm.

Für die Messung wurden 10 µl der aufgereinigten Markierungsreaktion 1:6 mit RNase freiem H₂O verdünnt und das Absorbitionsspektrum in einer Quarzküvette (d = 1 cm) gemessen. Das Spektrum wurde über einen Bereich von 700-500 nm gefahren und die Extinktion bei 550 und 650 nm ermittelt. Die eingebauten pmol der beiden Farbstoffe konnten nun nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{pmol Cy3 bzw. Cy5 in der Probe} = (A/E) \times (z \text{ } \mu\text{l}) \times F \times 10^{12}$$

- A = Absorbtion von Cy3 bei 550 nm bzw. Cy5 bei 650 nm
- E = Extinktionskoeffizient von Cy3 (150000 l mol⁻¹ cm⁻¹)
bzw. Cy5 (250000 l mol⁻¹ cm⁻¹)
- z (µl) = Volumen der cDNA-Lösung; µl entspricht 10⁻⁶ l
- F = Verdünnungsfaktor

3.8.4. Hybridisierung der cDNA

Hybridisierung der *probes* mit markierter *target-cDNA* für PCR-basierende DNA-Microarrays

Die Hybridisierung der *probes* mit der markierten *target-cDNA* erfolgte vollautomatisch mit dem *Automated Slide Processor* (ASP Lucidea, Amersham Pharmacia Biotech). Vorbereitend wurde die *target-cDNA* denaturiert und die benötigten Hybridisierungskammern des ASP gespült. Die Denaturierung der *target-cDNA* erfolgte durch 5 minütiges Inkubieren bei 95°C, anschließender Abkühlung auf Eis und der Zugabe von 50 µl Microarray Hybridization Buffer des Cyscribe First Strand cDNA Labeling Kits (Amersham Biosciences), sowie 110 µl 100% (v/v) Formamid. Der Ansatz wurde gemischt, bei 13000 U/min kurz abzentrifugiert und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Anschließend wurden 200 µl des Hybridisierungsansatzes mit einer Hamiltonspritze in die Hybridisierungskammer des ASP, in welche bereits ein gespotteter DNA-Microarray eingespannt war, injiziert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem folgenden Programm:

ASP-Hybridisierungsprogramm:

00	Wait	Check dummy slides (Überprüfen, ob in jeder Kammer ein dummy Slide ist)
01	Flush	Leeren der Schläuche und Kammern von alten Lösungen
02	Heat	Kammern auf 38°C aufheizen
03	Flush	Kammern mit Isopropanol spülen und leeren
04	Flush	Kammern mit Wasser spülen und leeren
05	Air Pump	Kammern für 60 sec mit Luft spülen
06	Heat Switch Off	Heizung ausschalten
07	Prime	Schläuche mit Wash 1 (Lösung 3) füllen
08	Wait	INSERT TEST SLIDES - Test slides einlegen
09	Heat	Kammern auf 42°C aufheizen
10	Wait	Inject probe solution – Proben-Lösung injizieren
11	Mix	Mischen der Lösungen in den Kammern für 12 Stunden
12	Flush	Mit Wash 1 spülen

13	Heat	Kammern auf 45°C aufheizen
14	Mix	Mischen mit Wash 1 für 10 min
15	Prime	Schläuche mit Wash 2 (Lösung 4) füllen
16	Flush	Mit Wash 2 spülen
17	Mix	Mischen mit Wash 2 für 10 min
18	Flush	Mit Wash 2 spülen
19	Mix	Mischen mit Wash 2 für 4 min
20	Prime	Schläuche mit Wash 3 (Lösung 2) füllen
21	Flush	Mit Wash 3 spülen
22	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
23	Flush	Mit Isopropanol spülen
24	Flush	Kammern mit Luft spülen
25	AirPump	Kammern mit Luft trocknen
26	Heat	Heizung ausschalten
27	Wait	REMOVE TEST SLIDES Test slides entfernen und mit dummy slides ersetzen
28	Heat	Heizen auf 48°C
29	Flush	Mit Wash 2 spülen
30	Mix	Mischen mit Wash 2 für 5 min
31	Prime	Schläuche mit Wasser füllen
32	Flush	Mit 6 ml Wasser spülen
33	Mix	Mischen mit Wasser für 5 min
34	Flush	Mit 6 ml Wasser spülen
35	Flush	Mit Luft spülen
36	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
37	Flush	Mit Isopropanol spülen
38	Flush	Mit Luft spülen
39	Air Pump	Kammern mit Luft trocknen

[Ende]

Erläuterung der Programmbefehle:

- Air Pump: Trocknen der Kammer durch Luft
 Flush: Spülen der Hybridisierungskammern und Schläuche
 Heat: Heizen der Kammer auf eine bestimmte Temperatur
 Mix: Mixen der Lösung innerhalb der Kammer durch Vor- und Zurückpumpen
 Prime: Füllen der Schläuche bis zur Hybridisierungskammer
 Wait: Warten bis zu einer Bestätigung vom User

Lösungen:

- Lösung 1: H₂O
 Lösung 2: Wash 3 (0,1x SSC)
 Lösung 3: Wash 1 (1x SSC / 0,2% SDS)
 Lösung 4: Wash 2 (0,1x SSC / 0,2% SDS)
 Lösung 5: Isopropanol

Hybridisierung der *probes* mit markierter *target*-cDNA für Oligo-basierende DNA-Microarrays

Lösungen für die Hybridisierung Oligo-basierender DNA-Microarrays

Tom-Freeman-Hybridisierungspuffer (Fitzpatrick et al., 2005)

Formamid (deionisiert)	20	ml
50x Denhart's solution	5,0	ml
20x SSC	12,5	ml
100 mM Na-Pyrophosphat	0,5	ml
1 M Tris (pH 7,4)	2,5	ml
10% SDS	0,5	ml
HLPC-H ₂ O	9,0	ml
sterilfiltrieren		

Wie bei den PCR-basierenden DNA-Microarrays erfolgte die Hybridisierung vollautomatisch mit dem *Automated Slide Processor*. Für die Hybridisierung wurden etwa 80 pmol pro Farbstoff der Markierungsreaktion eingesetzt und in einem

Reaktionsgefäß vereinigt. Während die benötigten Hybridisierungskammern des ASP gespült wurden, erfolgte die Denaturierung der *target*-cDNA durch 5 minütiges Inkubieren bei 95°C. Der Hybridisierungsansatz wurde unverzüglich auf Eis gestellt und mit Tom-Freeman-Hybridisierungspuffer bis zu einem Volumen von 210 µl aufgefüllt. Im Anschluss daran wurde dieser gemischt und nach kurzer Zentrifugation bei 13000 U/min lichtgeschützt auf Eis gelagert. Nach dem Einspannen des gespotteten Microarrays in die Hybridisierungskammer des ASP wurden 200 µl des Hybridisierungsansatzes mit einer Hamiltonspritze in letztere injiziert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem folgenden Programm:

ASP-Hybridisierungsprogramm:

00	Wait	Check dummy slides (Überprüfen, ob in jeder Kammer ein dummy Slide ist)
01	Flush	Leeren der Schläuche und Kammern von alten Lösungen
02	Heat	Kammern auf 48°C aufheizen
03	Flush	Kammern mit Isopropanol spülen
04	Flush	mit Luft spülen
05	Air Pump	Kammern mit Luft trocknen
06	Heat Switch Off	Heizung ausschalten
07	Prime	Schläuche mit Wash 1 (Lösung 3) füllen
08	Wait	INSERT TEST SLIDES - Test slides einlegen
09	Heat	Kammern auf 55°C aufheizen
10	Wait	Inject probe solution – Proben-Lösung injizieren
11	Mix	mischen der Lösungen in den Kammern für 15 Stunden
12	Heat Switch Off	Heizung ausschalten
13	Flush	mit Wash 1 spülen
14	Mix	Mischen mit Wash 1 für 2 min
15	Flush	mit Wash 1 spülen
16	Prime	Schläuche mit Wash 3 (Lösung 2) füllen
17	Flush	Mit Wash 3 spülen
18	Flush	Kammern mit Luft spülen
19	Heat	Kammern auf 37°C aufheizen
20	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen

21	Flush	mit Isopropanol spülen
22	Flush	Kammern mit Luft spülen
23	Flush	Kammern mit Luft spülen
24	AirPump	Kammern mit Luft trocknen
25	Heat Switch Off	Heizung ausschalten
26	Wait	REMOVE TEST SLIDES Test slides entfernen und mit dummy slides ersetzen
27	Heat	Heizen auf 48°C
28	Flush	mit Wash 2 spülen
29	Mix	Mischen mit Wash 2 für 5 min
30	Prime	Schläuche mit Wasser füllen
31	Flush	mit 6 ml Wasser spülen
32	Mix	Mischen mit Wasser für 5 min
33	Flush	mit 6 ml Wasser spülen
34	Flush	mit Luft spülen
35	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
36	Flush	mit Isopropanol spülen
37	Flush	mit Luft spülen
38	Air Pump	Kammern mit Luft trocknen

[Ende]

Erläuterungen der Programmbefehle und Lösungen sind dem Abschnitt zur Hybridisierung PCR-basierender DNA-Microarrays zu entnehmen.

3.8.5. Quantifizierung der Microarraydaten mit GenePix Pro 6.0

Zur Verarbeitung der Hybridisierungsdaten wurden diese mit dem Scanner GenePix 4000B (AXON Instruments, Union City) und dem Programm GenePix Pro 6.0 visualisiert. Bereits während des Scannens erfolgte bei Verwendung der PCR-basierenden DNA-Microarrays eine erste Normalisierung der Arraydaten über Kontrollproben der sog. *Scorecard*. Hierbei handelt es sich um spezifische DNA, welche mit den *probes* gespottet wurde. Diese DNA wurde mit spezifischer RNA, die als *spike mix* dem Markierungsansatz hinzugefügt wurde, hybridisiert. Da die beiden den

Markierungsansätzen hinzugefügten Kontrollen eine Fluoreszenzintensitätsverhältnis von 1:1 ergeben sollten, wurde bei dem Prescan die Scanstärke (PMT 635 nm – Cy5, PMT 532 nm – Cy3) für die beiden Farbstoffe anhand der Fluoreszenz der Kontrollen ermittelt. Bei den Oligo-basierenden DNA-Microarrays wurde die Scanstärke des Prescans anhand des Hintergrundes ermittelt. Anschließend erfolgte der Hauptscan mit folgenden Einstellungen:

Pixel size: 10 μm
Lines to average: 1
Focus position: 0 μm
Scan area: ca.1000 x 7000 Pixel

Für die Quantifizierung der Fluoreszenzwerte jedes einzelnen Spots in 'GenePix' wurde zunächst mit der Software eine Art Schablone auf den Chip gelegt, womit jedem Spot die entsprechende Annotation zugewiesen und der auszuwertende Bereich festgelegt wurde. Mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten Computerprogramms (Ehrenreich, unveröffentlicht) wurde die Schablone, basierend auf einer Excel-Belegungsliste (Microsoft, Redmond, USA), in Form eines *gal files* generiert. Die Ausrichtung dieser Schablone wurde für jeden einzelnen Spot manuell überprüft. Die Berechnung der Fluoreszenzwerte, des Hintergrundes und der Standardabweichung des Hintergrundes für beide Farbstoffe, sowie des *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und dem *Regression Ratio* erfolgte für jeden Spot automatisch durch das Programm GenePix Pro. Bei den *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und dem *Regression Ratio* handelt es sich um jeweils unterschiedliche mathematische Ansätze zu Ermittlung des mittleren Expressionswertes eines Spots. Jeder Spot besteht aus einer Vielzahl von einzelnen Bildelementen (Pixel), für welche jeweils ein Wert der Pixel-Intensität für die Wellenlänge 1 ($IP, \lambda 1$) und der Pixel-Intensität für die Wellenlänge 2 ($IP, \lambda 2$) vorliegt. Die Intensitäten der zwei Wellenlängen der den definierten Spot umgebenden Hintergrund-Pixel werden ebenfalls mit einbezogen ($IB, \lambda 1$ und $IB, \lambda 2$). Das mittlere Fluoreszenzverhältnis eines Spots wird aus den einzelnen Pixel-Intensitäten berechnet. Der *Ratio of Medians*, der dem geometrischen Mittel entspricht, wird häufig zur Berechnung von Mittelwerten herangezogen, da starke Abweichungen einzelner Werte aus mathematischen Gründen das Endergebnis weniger beeinflussen.

Ratio of Medians:

$$\frac{\left\{ \left(I_{P, \lambda 2} \right)_n \right\}_{med} - \left\{ \left(I_{B, \lambda 2} \right)_n \right\}_{med}}{\left\{ \left(I_{P, \lambda 1} \right)_n \right\}_{med} - \left\{ \left(I_{B, \lambda 1} \right)_n \right\}_{med}}$$

Der *Ratio of Means* hingegen kann mehr von starken Abweichungen einzelner Werte beeinflusst werden.

Ratio of Means:

$$\frac{\sum_{i=1}^n \langle I_{P, \lambda 2} - \left\{ \left(I_{B, \lambda 2} \right)_n \right\}_{med} \rangle_i}{\sum_{i=1}^n \langle I_{P, \lambda 1} - \left\{ \left(I_{B, \lambda 1} \right)_n \right\}_{med} \rangle_i}$$

Für die Berechnung des *Regression Ratios* ist eine Definition von Pixel, die zu dem eigentlichen Spot gehören, und Hintergrund-Pixel durch die 'Schablone' nicht nötig. Jeder Pixel innerhalb des zweifachen Spotdurchmessers, unabhängig von seiner Position, wird einbezogen. Das Verhältnis der beiden Wellenlängen zueinander wird mittels linearer Regression zwischen den zwei sich ergebenden Pixelwolken ermittelt (Abbildung 3.3).

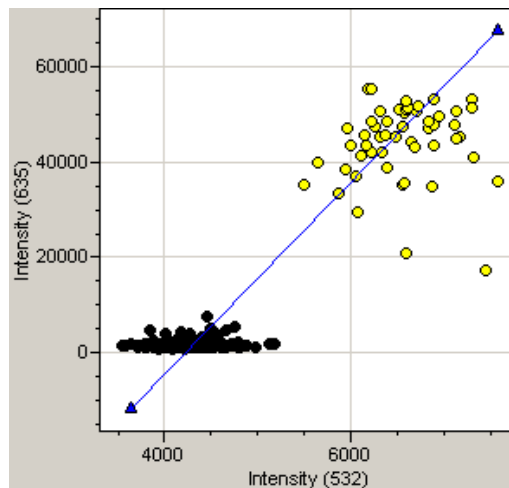


Abbildung 3.3: *Regression Ratio* eines einzelnen Spots. Aufgetragen sind die Intensitäten der einzelnen Pixel bei 532 nm gegen die Intensitäten bei 635 nm. Die schwarzen Punkte liegen im Hintergrund, die gelben heben sich vom Hintergrund ab. Die blaue Linie stellt die mathematisch ermittelte Regressionsgerade dar, ihre Steigung gibt das durchschnittliche Verhältnis der Pixelintensitäten und damit der *Regression Ratio* an.

Die Ergebnisse konnten in Form einer Datentabelle und eines *Scatterplots* eingesehen werden. An dieser Stelle erfolgte eine weitere Normalisierung der Daten. Unter der Voraussetzung, dass sich unter den zu vergleichenden Bedingungen nur die Expression einzelner Gene verändert und die Expression eines Großteils der Gene unverändert bleibt, wurde im *Scatterplot* die Hauptwolke der Gene auf die Winkelhalbierende gelegt, also in den Bereich eines Regulationsfaktors von 1. Eine logarithmische Auftragung der Expressionswerte vereinfacht dieses Verfahren zusätzlich, da Spots mit einem Expressionsfaktor von annähernd 1 gestaucht werden und sich die Dichte der Hauptwolke der Daten erhöht (Abb. 3.4).

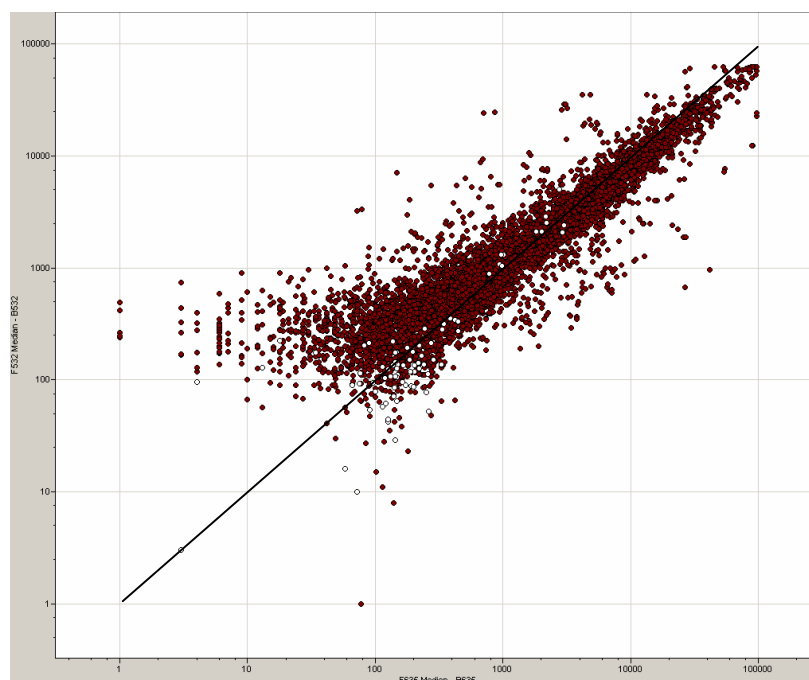


Abbildung 3.4: Logarithmische Auftragung der Expressionswerte eines Microarrays als *Scatterplot* im Programm GenePix Pro. Die Hauptwolke der Gene liegt nach der Normalisierung im Bereich der Winkelhalbierenden.

3.8.6. Analyse der Transkriptionsdaten

Für die weitere Bearbeitung und Analyse der normalisierten Transkriptionsdaten wurden diese aus GenePix Pro in das Programm Excel (Microsoft, Redmond, USA) exportiert. Hier wurden sämtliche Daten auf Qualität und somit Aussagekraft überprüft. Alle Daten wurden daraufhin gefiltert, dass die Fluoreszenzsignale für Rot und Grün

selbst, und nach Abzug der Standardabweichung des Hintergrundes einen Wert größer Null besaßen. Ein weiteres Merkmal für die Qualität eines Spots war, dass die nach unterschiedlichen mathematischen Verfahren berechneten Expressionsverhältnisse, *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und der *Regression Ratio*, für einen Spot nicht mehr als 30% voneinander abweichen. Bei starken Diskrepanzen dieser Werte, kann man methodische Artefakte nicht ausschließen. Im Anschluss an die Evaluation der Daten wurden alle ORFs, deren Expression sich unter den jeweiligen Bedingungen mindestens um einen Faktor 3 änderte, herausgefiltert, mit anderen Chipdaten verglichen und ihre Funktion im Stoffwechsel beurteilt.

3.9. Analyse von Kulturüberständen

3.9.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Detektion von Aminosäuren gibt es verschiedene Methoden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Detektion der Aminosäuren im Kulturüberstand zunächst mittels Dünnschichtchromatographie. Aufgrund der schnelleren Durchführung und der leichteren Quantifizierung wurde dazu übergegangen die Aminosäuren mit der Ionenchromatographie (3.9.2.) zu bestimmen.

Vorbereitend wurde zunächst das Laufmittel ca. 1 cm hoch in die Entwicklungskammer eingefüllt und diese abgedeckt. Hierbei ist darauf zu achten, dass ausreichend Laufmittel in der Kammer vorhanden ist, aber auf der anderen Seite darf das Laufmittel nicht in Kontakt mit der Auftragszone der Kieselgelplatte kommen. Zunächst diente ein Gemisch aus Butanol/Eisessig/H₂O (v/v, 4:1:1) als Laufmittel. Eine bessere Auftrennung der Komponenten konnte aber mit einem Gemisch aus Ethanol/H₂O (v/v, 70:30) erzielt werden. Während sich die Atmosphäre in der Entwicklungskammer mit dem Dampf des Laufmittels anreicherte, wurden auf einer Kieselgelplatte (DC-Plastikfolien 20x20 cm Kieselgel 60, Merck 5748) etwa 2 cm vom unteren Rand vorsichtig die Startlinie und die Auftragspunkte mit einem weichen Bleistift markiert. Damit die Proben nicht ineinander laufen, sollte zwischen den Auftragsbanden ein Abstand von 0,5 bis 1 cm eingehalten werden. Mit einer 10 µl Pipette wurden jeweils 10 µl der in H₂O gelösten Aminosäure (5 µg/µl) bzw. des verdünnten Kulturüberstandes

aufgetragen und getrocknet. Die Lösungen sollten möglichst kleine Flecken ergeben. Die Dünnschichtplatte wurde anschließend in die Kammer gestellt und das Laufmittel begann infolge der Kapillarkräfte nach oben zu wandern. Dabei werden die einzelnen Komponenten unterschiedlich stark mitgenommen. Nach etwa 2,5 bis 3 Stunden, bis die Lauffront 10 cm vorangeschritten war, wurde die Kieselgelplatte aus der Kammer entnommen und getrocknet. Anschließend wurde diese mit dem Ninhydrin-Sprühreagenz (0,2 g in 95 ml n-Butanol und 5 ml Essigsäure) besprüht und für 10 min bei 110°C inkubiert. Ninhydrin bewirkt hierbei über die Bildung einer Schiffischen Base eine oxidative Decarboxylierung der Aminosäure. Die Hydrolyse der Schiffischen Base des decarboxylierten Produkts führt zu einem Aldehyd und einem Ninhydrinderivat, welches den Aminstickstoff trägt. Letzteres bildet mit dem mittleren Carbonyl-C-Atom eines zweiten Ninhydrinmoleküls eine Schiffische Base, welche durch Deprotonierung einen blauvioletten Farbstoff ergibt (Ruhemanns Violett). Die Ringstruktur von Prolin führt zu einer abweichenden Reaktionsfolge unter Bildung eines gelblichen Farbstoffes. Abschließend wurde die DC-Platte eingeschweißt und zur Dokumentation eingescannt (Abb.3.5).

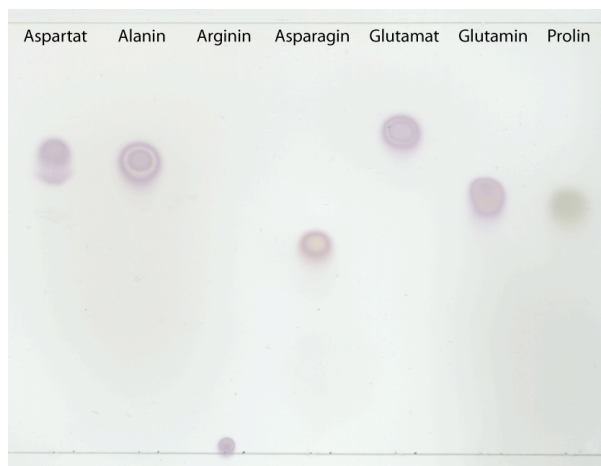


Abbildung 3.5: Repräsentative Dünnschichtchromatographie zur Darstellung von L-Aminosäuren. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus 96% EtOH, reinst und H₂O im Verhältnis 70:30 (v/v).

3.9.2. Ionenchromatographie (IC)

Zur Analyse von Kulturüberständen standen zwei Flüssigkeitschromatographiesysteme der Firma Dionex zur Verfügung. Zum einen war dies ein DX-500 System bestehend aus einer GP40 Gradientenpumpe, einem ED40 elektrochemischen Detektor und einem LC10 Chromatographie Organizer. Des Weiteren ein ICS-3000 Ionenchromatographiesystem mit eingebauten Leitfähigkeits- und elektrochemischen Detektor. Zusätzlich war ein VWD-3100 (*Variable Wavelength Detector*) der *Ultimate 3000* Serie angeschlossen. Die Injektion der Proben erfolgte bei diesem System mit einem AS40 Autosampler. Gesteuert wurden beide Chromatographiesysteme mit dem Chromatographie Management System Chromeleon[®]. Mithilfe dieser Software erfolgte auch die Auswertung der Chromatogramme. Die im Weiteren beschriebenen analytischen Säulen mit zugehörigen Guard-Säulen wurden ebenfalls von der Firma Dionex bezogen. Zur Herstellung der Eluenten wurde *Milipore*-H₂O (18 MΩ-cm) verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurde dieses steril filtriert (0,22 µm Nylon-Filter, Nalgene), vorsichtig in geeignete Behältnisse überführt und im Anschluss daran mit Helium 5.0 für 10 min durchströmt. Um eine Kontamination mit Carbonat zu minimieren, welche im Verlust der Chromatographieauflösung und –effizienz resultiert, wurden für Natriumhydroxid-Eluenten eine 50%ige Natriumhydroxid-Lösung (Fluka, Product No 72064) verwendet. Die Eluenten waren permanent mit einem Druck von 5-8 psi beaufschlagt. Zur Probenvorbereitung wurden zunächst 500 µl Aliquots aus Wachstumsexperimenten für 10 min gekühlt zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert. Nach geeigneter Verdünnung konnten die Proben mittels Ionenchromatographie analysiert werden. Standards wurden in *Milipore*-H₂O gelöst, steril filtriert (Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm) und nach geeigneter Verdünnung bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3.9.2.1. Quantitative Bestimmung von Alkoholen und Zuckern

Sowohl mit der CarboPac[™] MA1, als auch die CarboPac[™] PA1 konnte isokratisch eine Separation von Glucose, Glycerol und 2,3 Butandiol erzielt werden. Die Detektion erfolgte dabei elektrochemisch. Im Vergleich zur CarboPac[™] PA1 konnte mit der

CarboPac™ MA1 eine bessere Trennung der Alkohole erreicht werden, welches aber mit längeren Laufzeiten einherging. Des Weiteren konnte mit beiden analytischen Säulen die proteinogenen Aminosäuren L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Glutamin und L-Prolin getrennt werden. Zusätzlich konnte mit der CarboPac™ MA1 die nicht-proteinogene Aminosäure L-Ornithin und Harnstoff separiert werden.

Generelle Parameter zur Durchführung mit der CarboPac™ MA1-Säule:

System:	DX-500
Säulen:	CarboPac™ MA1 (4 x 250 mm, P/N 044066) CarboPac™ MA1 Guard (4 x 50 mm, P/N 044067)
Flußrate:	0,4 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Temperatur:	RT
Detektion:	integrierte gepulste Amperometrie, Goldelektrode
Eluenten:	A: Wasser B: 1 M NaOH

Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	52	48
70.0	52	48

Waveform elektrochemischer Detektor:

Zeit (sec)	Potential (V) vs. Ag/AgCl	Integration
0.00	0,10	
0.20	0,10	Start
0.40	0,10	Ende
0.41	-2,00	
0.42	-2,00	
0.43	0,60	
0.44	-0,10	
0.50	-0,10	

Generelle Parameter zur Durchführung mit der CarboPac™ PA1-Säule:

System:	DX-500
Säulen:	CarboPac™ PA1 (4 x 250 mm, P/N 035391) CarboPac™ PA1 Guard (4 x 50 mm, P/N 043096)
Flußrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Temperatur:	RT
Detektion:	integrierte gepulste Amperometrie, Goldelektrode
Eluenten:	A: Wasser B: 1 M NaOH

Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	75	25
70.0	75	25

Waveform elektrochemischer Detektor: siehe Durchführung CarboPac™ MA1-Säule

3.9.2.2. Quantitative Bestimmung von Anionen

Zur Bestimmung von Anionen im Kulturüberstand standen zwei Möglichkeiten der Detektion zur Verfügung. Zum einen konnten Lactat, Acetat, Formiat und andere organische Säuren mittels supprimierter Leitfähigkeit mit dem Dionex ICS-3000 System unter Verwendung der analytischen Säule IonPac® AS11-HC in Kombination mit einer vorgeschalteten IonPac® AG11-HC Guard-Säule gemessen werden. Als Suppressor diente der ASRS® Ultra II. Die Separation erfolgte mit einem Natriumhydroxidgradienten bei einer Flußrate von 0,38 ml/min.

Generelle Parameter zur Durchführung mit der IonPac[®] AS11-HC-Säule:

System: ICS-3000
Säulen: IonPac[®] AS11-HC (2 x 250 mm, P/N 052961)
IonPac[®] AG11-HC Guard (2 x 50 mm, P/N 052963)
Flußrate: 0,38 ml/min
Injektionsvolumen: 2,5 µl
Temperatur: 30°C
Detektion: supprimierte Leitfähigkeit, ASRS[®] Ultra II (2 mm, P/N 061562)
AutoSuppression recycle mode
Eluenten: A: Wasser
B: 5 mM NaOH
C: 100 mM NaOH

Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0.0	80	20	0
8.0	80	20	0
18.0	85	0	15
28.0	70	0	30
38.0	40	0	60
40.0	40	0	60
40.1	80	20	0
50.0	80	20	0

Die analytische Säule Acclaim[®] OA stellte eine weitere Möglichkeit zur Trennung von organischen Säuren dar. Die Separation erfolgte isokratisch mit einer Flußrate von 0,6 ml/min und die Substanzen wurden im Anschluss daran bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert.

Generelle Parameter zur Durchführung mit der Acclaim[®] OA-Säule:

System: ICS-3000
Säulen: Acclaim[®] OA (4 x 250 mm, P/N 062902)
Acclaim[®] OA Guard (4,3 x 10 mm, P/N 062925)
Flußrate: 0,6 ml/min
Injektionsvolumen: 10 µl
Temperatur: 30°C
Detektion: UV, 210 nm
Eluenten: A: Wasser
B: 200 mM Na₂SO₄, pH 2,68
(mit Methansulfonsäure eingestellt)

Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	50	50
30.0	50	50

3.9.2.3. Quantitative Bestimmung von Kationen

Die Detektion von Ammonium erfolgte mittels supprimierter Leitfähigkeit unter Verwendung der analytischen Säule IonPac[®] CS18 und zugehöriger IonPac[®] CG18 Guard-Säule. Als Suppressor diente der CSRS[®] Ultra II.

Generelle Parameter zur Durchführung:

System:	ICS-3000
Säulen:	IonPac [®] CS18 (2 x 250 mm, P/N 062878) IonPac [®] CG18 Guard (2 x 50 mm, P/N 062880)
Flußrate:	0,25 ml/min
Injektionsvolumen:	5 µl
Temperatur:	40°C
Detektion:	supprimierter Leitfähigkeit, CSRS [®] Ultra II (2 mm, P/N 061564) AutoSuppression recycle mode
Eluenten:	A: Wasser B: 50 mM Methansulfonsäure

Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	94	6
5.0	94	6
20.0	64	36
25.0	10	90
35.0	10	90
35.1	94	6
50.0	94	6

3.9.2.4. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

Mithilfe eines Gradienten konnten Aminosäuren unter Verwendung der analytischen Säule AminoPac[™] PA10 getrennt werden. L-Cystein wurde unter diesen alkalischen Bedingungen zu Cystin umgewandelt. Die Detektion erfolgte elektrochemisch.

Anders als eingangs beschrieben wurde zur Herstellung des Acetat-Eluenten zunächst das Na-Acetat (wasserfrei, Dionex, P/N 059326) in *Milipore*-H₂O gelöst und im Anschluss daran steril filtriert (0,22 µm Nylon-Filter, Nalgene). Nach der Begasung mit Helium 5.0 für 10 min erfolgte die Zugabe des Natriumhydroxid.

Generelle Parameter zur Durchführung:

System:	ICS-3000
Säulen:	AminoPac™ PA10 (2 x 250 mm, P/N 55406) AminoPac™ PA10 Guard (2 x 50 mm, P/N 55407)
Flußrate:	0,25 ml/min
Injektionsvolumen:	25 µl
Temperatur:	30°C
Detektion:	integrierte gepulste Amperometrie, Goldelektrode
Eluenten:	A: 10 mM NaOH B: 250 mM NaOH C: 25 mM NaOH + 1 M Na-Acetat

Waveform elektrochemischer Detektor:

Zeit (sec)	Potential (V) vs. Ag/AgCl	Integration
0.00	-0,20	
0.04	-0,20	
0.05	0,00	
0.21	0,00	Start
0.22	+0,22	
0.46	+0,22	
0.47	0,00	
0.56	0,00	Ende
0.57	-2,00	
0.58	-2,00	
0.59	+0,60	
0.60	-0,20	

Gradientenmethode:

Zeit (min)	Curve Type	A (%)	B (%)	C (%)
0.0	5	79.2	20.8	0.0
2.0	5	79.2	20.8	0.0
8.0	8	66.7	33.3	0.0
11.0	8	66.7	33.3	0.0
18.0	8	45.8	14.2	40.0
21.0	5	50.0	10.0	40.0
23.0	8	21.9	8.1	70.0
42.0	5	21.9	8.1	70.0
42.1	5	20.8	79.2	0.0
44.1	5	20.8	79.2	0.0
44.2	5	79.2	20.8	0.0
75.0	5	79.2	20.8	0.0

3.9.3. Gas-Chromatographie (GC)

Die qualitative Detektion von Ethanol erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau S. Dummert (AG Schwarz, TU München). Zum Einsatz kam das Gerät GC-2010 der Firma Shimadzu mit einer Stabilwax-DA-Säule. Als Trägergas diente Stickstoff.

Methode:

Zeit (min)	Temperatur (°C)
0.0	70
5.0	98
20.0	250

3.9.4. Quantitative Bestimmung von Acetat

Zur Bestimmung von Acetat in Kulturüberständen wurde ein UV-Test der Firma R-BIOPHARM (Best. Nr. 10 148 261 035) verwendet. Nach geeigneter Verdünnung des Kulturüberstandes erfolgten die Messungen bei einer Temperatur von 25°C und einer Wellenlänge von 340 nm mit dem Varian Cary 100 scan UV-Visible

Spectrophotometer. Die Ansätze wurden nach Anleitung des Hersteller pipetiert, mit dem Unterschied, dass das Testvolumen 1 ml betrug.

3.9.5. Quantitative Bestimmung von Acetoin

Acetoin wurde colorimetrisch im Kulturüberstand bei einer Wellenlänge von 546 nm, wie bei Westerfeld (1945) beschrieben, bestimmt. Als Reagenzien dienten eine 0,5%ige Creatin-Lösung (0,1 g in 20 ml H₂O) und eine 5%ige 1-Naphthol-Lösung (1g in 20 ml 2,5 N NaOH). Die Lösungen wurden frisch angesetzt. Der Kulturüberstand wurde geeignet verdünnt, die 0,5%ige Creatin-Lösung zugegeben und im Anschluss daran die 5%ige Naphthol-Lösung. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 30°C.

3.9.6. Quantitative Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff

Die Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff im Kulturüberstand erfolgte mit einem UV-Test der Firma R-BIOPHARM (Best. Nr. 10 542 946 035). Wie bereits bei der quantitativen Bestimmung von Acetat beschrieben, erfolgten die Messungen nach geeigneter Verdünnung des Kulturüberstandes bei einer Temperatur von 25°C und einer Wellenlänge von 340 nm mit dem Varian Cary 100 scan UV-Visible Spectrophotometer. Die Ansätze wurden nach Anleitung des Hersteller pipetiert, wiederum mit dem Unterschied, dass das Testvolumen 1 ml betrug.

3.10. Oligonukleotide

Tabelle 3.11: Primer *real-time* RT-PCR. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Eurofins MWG Operon Sequencing Department, Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Primer	Sequenz (5' → 3')
blanRNRfor	CGAGAGTTCCAGACATTATGCG
blanRNRrev	GACCAATGGTATCTGACAGCAAG
blcydBfor	GTACTCACTGTCCTGACATGC
blcydBrev	GACAAGGGTAACAGCATGTCTG
blglcKfor	GGAGGCAACAACAGTAAACTCGC
blglcKrev	ATGTGCTTCGGTTTGCCGAG
blaslDfor	GTCTATCAGGTCTCAACGATGG
blalsDrev	CGGAACGGAGACGGTAAAAC
blldhfor	CATGGCAACTCCGTAGTATGTC
blldhrev	GTCTGGAGCCATGCGAATATC
blsdhBfor	CACTCGTCAGGATACATCGG
blsdhBrev	GTTTCATATCCCAAGCAATCGGC
blrpoEfor	GGGAAAGAAGAGCTGGAAGAC
blrpoErev	GTCGGCTGGGTTTCTTCATC
bldeaDfor	GGGATGTTGTGGTGAAATCGC
bldeaDrev	GTCAAATCCTCCTTAACCTGAGC
ackA_fwd_rt	CGGTTTCCATGGTACATCTC
ackA_rev_rt	AAGCGGTGTGAAGCCATTG
BLi02132_fwd_rt	GCGCCTGAACCGAATTTAAC
BLi02132_rev_rt	GGCGATTCCGTAGTCATCAC
glpD_fwd_rt	CAACAGACACCGTCTACAAC
glpD_rev_rt	TCATGAATCAGCGGTCTGAG
mmgE_fwd_rt	TCCGCTGGCTCGATTATAAC
mmgE_rev_rt	CCTTAACAATTGCCGTCAGG
BLi04049 rt fwd	GGGCATGATGGAGACGTTTG
BLi04049 rt rev	CTTCTGCTGCGCTTCTTGAG

Tabelle 3.11: Primer *real-time* RT-PCR. Fortführung.

Primer	Sequenz (5' → 3')
acoR rt fwd	TTTCCGACTGGAGGAGAATG
acoR rt rev	GAAACGGGATACGAGTGATG
mmsA rt fwd	AACCCGGCTTCATAGAACAG
mmsA rt rev	GATTTGGCGCTATCCTTTGG
BLi04275 rt fwd	CCAATCCGCTCAACATTGC
BLi04275 rt rev	CAATCGCCACGTCTACAAC
pdhD rt fwd	TCGAAGTGAAAGGCGAAGAG
pdhD rt rev	GATGATGTCACCGATCGCATAG
blrecOfor	CGAAAGCATGAGGAATATCCGC
blrecOrev	TACCGTCATTCAGCCTCCTC

Tabelle 3.12: Primer *clean Deletion* - Mutation. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Eurofins MWG Operon Sequencing Department, Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
mmgE_FA_fwd	TGCTGGATCCGCTTTACAGCGAGCA CGAAATG	BamHI
mmgE_FA_rev_MS	GACCAATCGGGTATTCGACGTAACG GGCGGTTTCAATC	
mmgE_FB_fwd_MS	GATTGAAACCGCCCGTTACGTCGAA TACCCGATTGGTC	
mmgE_FB_rev	TGCTCCATGGAGGAGCGGCGCTTTA ATG	NcoI
mmgE_check_fwd	ACAGCCGTCTTTGATCAG	
mmgE_check_rev	GGTAATGGCAGCCATTCC	

3.11. Enzyme

DNase (10000 U)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Proteinase K (15 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Taq DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Phire DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
BamHI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
EcoRI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
NcoI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
PstI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

3.12. Chemikalien und sonstige Geräte

Sofern nicht anders angegeben wurden alle sonstigen verwendeten allgemeinen Chemikalien von Merck, Serva, Fluka, Sigma oder Roth in p.a. Qualität bezogen.

Autoklav	Zirbus, Bad Grund, Deutschland
Biofuge fresco (Sorvall # 3328)	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Biofuge primo R (Sorvall # 7588)	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Primus HT	MWG AG Biotech
Magnet-Heizrührer	JAK Werk, Staufen
Mikroskop Carl Zeiss	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories California USA
Vortex Genie 2 TM	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage Sartorius Bl 3100	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Typ 2462	
Typ 2254	
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach, Deutschland

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zum anaeroben Wachstum

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Thematik des fermentativen Wachstums von *B. licheniformis* DSM13 erneut aufgegriffen (vgl. Schwarzer, 2005). Hintergrund hierfür war zum einen, dass nun die Möglichkeit bestand Transkriptionsanalysen mit Oligo-basierenden DNA-Microarrays durchführen zu können. Im Gegensatz zu DNA-Microarrays, welche auf PCR-Produkten basieren, zeichnen sich diese durch die Ausbildung eines geringeren Hintergrundes während der Hybridisierung aus. Zum anderen konnten nun potentielle Fermentationsendprodukte mittels Ionenchromatographie detektiert werden.

4.1.1. Anaerobe Verwertung von Zuckern durch *B. licheniformis*

Um die anaerobe Verwertung von Zuckern durch *B. licheniformis* zu untersuchen, wurde der Organismus in einem definierten Medium angezogen (vgl. 3.2.2. & 3.3.2.). Als C-Quellen dienten neben den Pentosen Arabinose, Ribose, Xylose und den Hexosen Fructose, Galaktose und Glucose, auch die Disaccharide Maltose und Saccharose (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Potenzielle Kohlenstoffquellen. Verwendet wurde ein Medium wie es unter 3.2.2. beschrieben ist, mit den angeführten Zuckern als Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 50 mM. Betrachtet wurde das Wachstum über einen Zeitraum von 50 Stunden. + Wachstum, - kein Wachstum

Kohlenstoffquelle	Wachstum anaerob	Wachstum aerob
L-Arabinose	-	+
D-Ribose	-	+
D-Xylose	-	+
D-Fructose	+	+
D-Galaktose	-	+
D-Glucose	+	+
Maltose	(+)	+
Saccharose	+	+

Betrachtet man vergleichend die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen durch DSM13, so ist zu beobachten, dass DSM13 unter anaeroben Wachstumsbedingungen keine der getesteten Pentosen verwerten konnte. Von den Hexosen konnten nur Glucose und Fructose, nicht aber Galaktose als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Die Disaccharide Maltose und Saccharose konnten ebenfalls unter anaeroben Kultivierungsbedingungen verwertet werden, wobei einschränkend erwähnt werden muss, dass DSM13 ein schwaches Wachstum mit Maltose zeigte. Wurden diese Versuche hingegen unter aeroben Kultivierungsbedingungen durchgeführt, so war bei allen getesteten Kohlenstoffquellen, Pentosen, Hexosen, wie auch Disacchariden, ein Wachstum zu beobachten.

4.1.2. Transkriptionsanalysen zum fermentativen Wachstum

Wie bereits eingangs erwähnt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Transkriptionsanalysen mit Oligo-basierenden DNA-Microarrays durchgeführt. Untersucht wurde die Genexpression bei Wachstum unter aeroben Bedingungen im Vergleich zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen. Zur Anzucht für diese vergleichenden Expressionsanalysen wurde ein definiertes Medium mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. Unter aeroben Bedingungen erfolgte die Kultivierung der Zellen in 100 ml Batch-Kulturen, die bei einer OD_{600} von 0,5 bis 0,6 geerntet wurden. Auch die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen erfolgte in Batch-Kulturen, das Volumen betrug jedoch hier 500 ml und die Zellen wurden bei einer OD_{600} von 0,2 geerntet (vgl. Schwarzer, 2005). Des Weiteren wurde das Medium für die anaerobe Anzucht mit Thiamin supplementiert (Broman et al., 1978). Ausgewertet wurden die vergleichenden Genexpressionsanalysen anhand von 4 Hybridisierungen. Die verwendete RNA stammte aus mindestens jeweils zwei biologisch unabhängigen Experimenten. Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass es sich bei den Angaben der Expressionsdaten um keine absoluten Werte handelt. Als signifikant wird eine Änderung des Expressionverhältnisses um mindestens den Faktor 3 eingestuft (vgl. 3.8.6.). Die im weiteren gezeigten Expressionsdaten sind logarithmisch zur Basis 2 dargestellt und eine Änderung um den Faktor 3 dieser Daten entspricht Werten von 1,5849 bzw. -1,5849.

4.1.2.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse des Wachstums unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen

Expression der Gene des Zentralstoffwechsels

Zunächst lag der Focus des Interesses auf den Genen des Zentralstoffwechsels von DSM13. Für die Gene der Glykolyse konnte im Rahmen dieser Untersuchungen keine signifikante Genregulation ermittelt werden. Eine Übersicht der beteiligten Gene und deren Expressionswerte ist im Anhang in der Tabelle 7.1 aufgeführt.

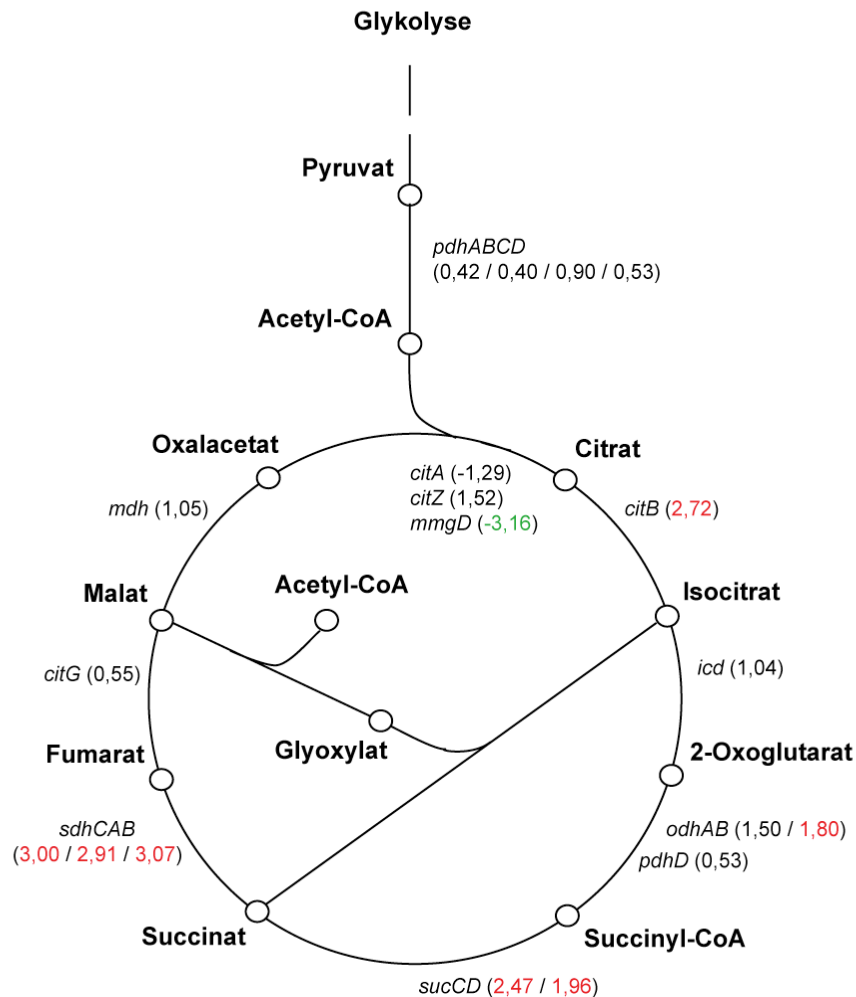


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Tricarbonsäurezyklus. Angegeben sind die Expressionsverhältnisse der beteiligten Gene bei Wachstum unter aeroben Bedingungen im Vergleich zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und repräsentative Einzelmessungen.

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse für den Tricarbonsäurezyklus sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Die in der eben genannten Abbildung verwendeten Gene und deren Funktion sind in der Tabelle 4.2 zu finden. Anders als im Zusammenhang mit der Glykolyse konnte für einige Gene des Tricarbonsäurezyklus eine signifikante Änderung der Expressionsverhältnisse beobachtet werden. Im Rahmen der Genomanalyse konnten für DSM13 drei Gene identifiziert werden, welche für Citrat-Synthasen kodieren. Eines dieser Gene, *mmgD*, zeigte unter anaeroben Wachstumsbedingungen eine erhöhte Expression. Auf der anderen Seite zeigten die Gene, welche an der Umsetzung zum Fumarat, ausgehend vom 2-Oxoglutarat, beteiligt sind, eine Induktion unter aeroben Kultivierungsbedingungen. Im Detail sind dieses Gene, die für die Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (*odhAB*), Succinyl-CoA-Synthase (*sucCD*) und Succinat-Dehydrogenase (*sdhCAB*) kodieren. Gene, welche für die Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase kodieren, *pdhABCD*, sowie die Gene der Fumarat Hydratase (*citG*) und der Malat-Dehydrogenase (*mdh*) zeigten keine Änderung des Expressionsverhältnisses.

Tabelle 4.2: Genkürzel und Funktionen der in Abbildung 4.1 dargestellten Gene des Tricarbonsäurezyklus.

Gen	Funktion
<i>citA</i>	Citratsynthase I
<i>citB</i>	Aconitat-Hydratase
<i>citG</i>	Fumarat-Hydratase
<i>citZ</i>	Citratsynthase II
<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase
<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase
<i>mmgD</i>	Citratsynthase III
<i>odhAB</i>	Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
<i>pdhABC</i>	Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase
<i>pdhD</i>	Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase / Untereinheit der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
<i>sdhCAB</i>	Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase
<i>sucCD</i>	Untereinheiten der Succinyl-CoA-Synthetase

Expressionsdaten anderer Enzyme

Ribonukleotidreduktasen katalysieren die Reduktion von Ribonukleosid-Triphosphaten zu den entsprechenden Desoxyribonukleotiden. Für die katalytische Aktivität der anaeroben Ribonukleotidreduktase ist ein Sauerstoff-sensitives Glycyl-Radikal entscheidend. Zuständig für dessen Generierung und somit für die Aktivierung der Ribonukleotidreduktase ist ein spezifisches Aktivierungsenzym (Sun et al., 1995). Durch die Genomanalyse von DSM13 konnten die Gene einer putativen anaeroben Ribonukleotidreduktase und zwei potentiell zugehöriger Aktivierungsenzyme identifiziert werden. Die ORFs der anaeroben Ribonukleotidreduktase (BLi03824) und eines der putativen Aktivierungsenzyme (BLi03823) sind direkt nebeneinander lokalisiert (Abb. 4.2). Flankiert werden diese *downstream* von dem Gen der Mannose-6-Phosphat-Isomerase (*pmi*) und *upstream* von einem Gencluster der Pectinverwertung (*kdgTAKR*). Das Gen des zweiten putativen Aktivierungsenzyms ist etwa 344 kb *upstream* lokalisiert.



Abbildung 4.2: Schematische Anordnung des ORFs der putativen anaeroben Ribonukleotidreduktase und der angrenzenden Gene im Genom von *B. licheniformis* DSM13. Erläuterung im Text.

Unter anaeroben Kultivierungsbedingungen konnte für den ORF der anaeroben Ribonukleotidreduktase (EC 1.17.4.2, BLi03824) eine signifikant erhöhte Expression ermittelt werden (Tab. 4.3). Für ein zugehöriges Aktivierungsenzym würde man ein ähnliches Verhalten erwarten. Tatsächlich konnte für eines der putativen Aktivierungsenzyme (BLi03823) mit einem Wert von -4,63 ebenfalls eine stärkere Expression unter diesen Wachstumsbedingungen beobachtet werden. Das Gen des zweiten putativen Aktivierungsenzym (BLi04172) hingegen zeigte mit einem Wert von 0,53 keine signifikante Änderung der Expression. Die Gene der aeroben Ribonukleotidreduktasen *nrdE* und *nrdF* waren während des fermentativen Wachstums reprimiert.

Tabelle 4.3: Expressionsverhältnisse der ORFs der Ribonukleotidreduktasen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse
			aerob / anaerob
BLi03824		putative anaerobe Ribonukleotidreduktase	-4,61
BLi03823		Aktivierungsenzym putative anaerobe Ribonukleotidreduktase	-4,63
BLi04172		Aktivierungsenzym putative anaerobe Ribonukleotidreduktase	0,53
BLi01966	<i>nrdE</i>	Ribonukleosid-diphosphat Reduktase (gr. Untereinheit)	1,74
BLi01967	<i>nrdF</i>	Ribonukleosid-diphosphat Reduktase (kl. Untereinheit)	1,93

Im Genus *Bacillus* konnten verschiedene Typen von terminalen Oxidasen identifiziert werden (von Wachenfeldt und Hederstedt, 2002). Zum einen sind dies Häm-Kupfer Oxidasen und zum anderen Oxidasen des Typs Cytochrom *bd*. Ersteren Typs können Cytochrom *aa₃*, sowie Cytochrom *caa₃* zugeordnet werden und dienen, im Gegensatz zu Oxidasen des Cytochrom *bd* Typs, als Protonenpumpen. Die vier Untereinheiten des Cytochroms *aa₃*, einer Quinol-Oxidase, werden von den Genen *qoxABCD* kodiert. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen werden diese reprimiert (Tab. 4.4). Die Gene, welche die vier Untereinheiten des Cytochroms *caa₃* kodieren, *ctaCDEF*, zeigten hingegen keine signifikante Expressionsänderung. Zur Expression des Cytochroms *bd* werden in *B. subtilis* alle durch die *cydABCD* kodierten Proteine benötigt (Winstedt et al., 1998). Hierbei stellen CydA und CydB die strukturellen Proteine der Oxidase dar. Eine Induktion unter anaeroben Kultivierungsbedingungen konnte sowohl für die kodierenden Gene dieser strukturellen Proteine, als auch für die am Transport beteiligten Gene *cydC* und *cydD* beobachtet werden. Anders hingegen die Expressionsverhältnisse der Gene *qcrABC*, die für die Untereinheiten des Cytochrom *bc* Komplexes kodieren. Hier konnte nur für die Gene *qcrB* und *qcrC*, nicht aber für das

Gen *qcrA* eine erhöhte Expression unter anaeroben Wachstumsbedingungen beobachtet werden.

Tabelle 4.4: Komponenten der Elektronentransportkette. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Häm-Protein	Funktion	log Expressionsverhältnisse aerob / anaerob
BLi01704	<i>ctaA</i>		Biosynthese von Cytochrom <i>caa₃</i>	-1,55
BLi01705	<i>ctaB</i>		<i>Assembly</i> Faktor Cytochrom <i>caa₃</i>	0,42
BLi01706	<i>ctaC</i>	Cytochrom <i>caa₃</i>	Cytochrom <i>caa₃</i>	0,48
BLi01707	<i>ctaD</i>		Oxidase	0,43
BLi01708	<i>ctaE</i>			0,53
BLi01709	<i>ctaF</i>			-0,09
BLi02391	<i>qcrA</i>	Cytochrom <i>bc</i>	Menaquinol- Cytochrom <i>c</i>	-0,39
BLi02390	<i>qcrB</i>		Cytochrom <i>c</i>	-1,37
BLi02389	<i>qcrC</i>		Oxidoreduktase	-1,52
BLi04040	<i>qoxA</i>	Cytochrom <i>aa₃</i>	Cytochrome <i>aa₃</i>	2,68
BLi04039	<i>qoxB</i>		Quinol-Oxidase	3,38
BLi04038	<i>qoxC</i>			2,88
BLi04037	<i>qoxD</i>			2,87
BLi04134	<i>cydA</i>	Cytochrom <i>bd</i>	Cytochrome <i>bd</i>	-4,94
BLi04133	<i>cydB</i>		Ubiquinol-Oxidase	-5,47
BLi04132	<i>cydC</i>		ABC-Transporter	-5,57
BLi04131	<i>cydD</i>		ABC-Transporter	-5,50

Im folgendem wurden nun die Expressionsverhältnisse von Genen, welche mit der Nitrat/Nitrit-Atmung im Zusammenhang stehen, untersucht. Neben den Genen *resD* und *resE*, welche für Zwei-Komponenten Regulatorproteine in *B. subtilis* kodieren (Sun et al., 1996), zeigten auch weitere Komponenten der Nitrat/Nitrit-Atmung eine

Tabelle 4.5: Expressionsverhältnisse von Komponenten der Nitrat/Nitrit-Atmung. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Werte, die mit einem Stern versehen sind, erfüllen nicht vollständig die Kriterien zur Ermittlung der Expressionsverhältnisse wie unter 3.8.6. beschrieben. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. n.b. - nicht bestimmt

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse aerob / anaerob
BLi02456	<i>resD</i>	Zwei-Komponenten Response-Regulator	-2,23
BLi02458	<i>resE</i>	Zwei-Komponenten Histidin-Sensor Kinase	-1,87
BLi02080	<i>fnr</i>	transkriptionaler Regulator anaerober Gene	-4,37
BLi02081	<i>narK</i>	Nitrit Export Protein	-8,38
BLi02078	<i>arfM</i>	Regulator anaerober Gene	-8,97
BLi02074	<i>narG</i>	Nitrat-Reduktase (Untereinheit)	-8,97
BLi02073	<i>narH</i>	Nitrat-Reduktase (Untereinheit)	-8,97
BLi02072	<i>narJ</i>	Nitrat-Reduktase (Protein J)	-8,16
BLi02071	<i>narI</i>	Nitrat-Reduktase (Untereinheit)	-7,97
BLi03915	<i>moaA</i>	Molybdopterin Vorläufer	-2,64
BLi00482	<i>nasB</i>	assimilatorische Nitrat-Reduktase (Untereinheit)	-0,62
BLi00483	<i>nasC</i>	assimilatorische Nitrat-Reduktase (Untereinheit)	n.b.
BLi00484	<i>nasD</i>	assimilatorische Nitrit-Reduktase (Untereinheit)	-1,69
BLi00485	<i>nasE</i>	assimilatorische Nitrit-Reduktase (Untereinheit)	-1,39
BLi00486	<i>nasF</i>	Uroporphyrin-III-Methyltransferase	-1,25
BLi01006	<i>hmp</i>	Flavohämoglobin	-0,02*

erhöhte Expression unter anaeroben Wachstumsbedingungen (Tab. 4.5). Darunter befinden sich Gene der Nitrat-Reduktase (*narGHJI*), wie auch *narK*, involviert in den Nitrit Export. Ebenso Gene, welche für die Untereinheiten der assimilatorischen Nitrit-Reduktase (*nasD* und *nasE*) kodieren. Organisiert sind diese im Genom zusammen mit den Genen der assimilatorischen Nitrat-Reduktase (*nasB* und *nasC*) und dem Gen *nasF*, welches für ein Enzym kodiert, dass in der Synthese von Sirohäm involviert ist (Abb. 4.3).



Abbildung 4.3: Schematische Anordnung der Gene der assimilatorischen Nitrat- und Nitrit-Reduktasen im Genom von *B. licheniformis* DSM13. Erläuterung im Text.

Daneben sind in der Tabelle 4.5 Expressionsverhältnisse von Genen angegeben, die für Enzyme mit regulatorischer Funktion im Zusammenhang mit anaeroben Wachstum kodieren. Zu nennen wären hier die ORFs BLi02078 und BLi02080. Letzterer konnte bereits in *B. licheniformis* als Gen identifiziert werden, welches für den Sauerstoff sensitiven transkriptionalen Regulator Fnr kodiert (Klinger et al., 1998). Sowohl für *fnr* (BLi02080), als auch für *arfM* (BLi02078) konnten eine Induktion unter anaeroben Kultivierungsbedingungen beobachtet werden.

In diesem Zusammenhang ist die Lokalisation einiger der eben beschriebenen ORFs im Genom interessant (Abb. 4.4). So befinden sich die Gene *fnr*, *arfM* und Gene, welche für die Untereinheiten der Nitrat Reduktase (*narGHJI*) kodieren in Nachbarschaft zueinander. Ebenfalls dort lokalisiert ist das Gen *narK*. Ausgenommen *fnr* handelt es sich hierbei um Gene, welche mit Werten von etwa -8 eine sehr erhöhte Expression aufweisen (Tab. 4.5). Des Weiteren konnten mittels *virtual footprint*, einer Software die zur Vorhersage möglicher *binding sites* von Transkriptionsfaktoren in Prokaryoten dient (Münch et al., 2005), potentielle Fnr *binding sites* in *B. licheniformis* DSM13 identifiziert werden (Tab. 4.6).



Abbildung 4.4: Übersicht der genetische Anordnung von ORFs in *B. licheniformis* DSM13, welche im Zusammenhang mit Komponenten der Nitrat/Nitrit Atmung stehen.

Für die Suche der potenziellen Fnr *binding sites* wurde die Sequenz (TG₆TG₆TCACA) aus *B. subtilis* verwendet (Cruz Ramos et al., 1995). Unter anderem konnten jeweils *upstream* der Gene *narG*, *arfM* und *narK* mögliche Fnr *binding sites* identifiziert werden. In Tabelle 4.6 sind diese Bindemotive mit der Distanz zum Startcodon des jeweiligen ORFs angegeben.

Tabelle 4.6: Auswahl putativer Fnr *binding sites* in DSM13. Erläuterung im Text.

ID	Gen	Sequenz ^a	5'UTR ^b
BLi02081	<i>narK</i>	TGACCGT TGTG ACGTAAT TCACA ATGTTTTA	80
BLi02078	<i>arfM</i>	CAGTCGT TGTGA ATTAAT CACTG CGCCCTG	58
BLi02074	<i>narG</i>	AAACCAT TGTG ACAAATTTA ACA AGGTGCAG	65
BLi02132		AAAATAT TGTG ATGTTTAT TCAC ATTCAAACC	81
<i>B. subtilis</i>			
Consensus		- - - - - TGTGA - - - - - TCACA - - - - -	

^a Die Basen der Consensussequenz sind fett hervorgehoben.

^b Die angegebene Zahl steht für die Anzahl der Basenpaare von der ersten Base hinter dem Consensus bis zur ersten Base des Startcodons.

Die Pyruvat-Formiat-Lyase (*pfl*) katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat. Es konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein Radikalenzym handelt, dessen Bildung durch ein Aktivierungsenzym katalysiert wird (Knappe et al., 1984; Wagner et al., 1992). Im Genom von DSM13 konnte ein ORF für eine mögliche Pyruvat-Formiat-Lyase (EC 2.3.1.54) identifiziert werden. Beschrieben wurde dessen Produkt als putative Formiat-Acetyltransferase (BLi02132). Direkt daneben ist der ORF eines putativen Aktivierungsenzyms der Pyruvat-Formiat-Lyase (BLi02131) lokalisiert (Abb. 4.5).



Abbildung 4.5: Schematische Anordnung des ORFs der putativen Pyruvat-Formiat-Lyase und der angrenzenden Gene im Genom von *B. licheniformis* DSM13. Erläuterung im Text.

Begrenzt werden dieses Gene *upstream* von *dacC*, ein Gen welches für ein Penicillinbindendes Protein kodiert und *downstream* von den Genen *yngKD*, dessen Funktionen bisher nicht bekannt sind. Interessanterweise konnte auch vor dem ORF der putativen Pyruvat-Formiat-Lyase eine potenzielle Fnr *bindig site* identifiziert werden (Tab. 4.6). Sie befindet sich 81 bp *upstream* des ORFs und liegt hoch konserviert vor.

Tabelle 4.7: Expressionsverhältnisse der Gene der putativen Pyruvat-Formiat-Lyase und des Multienzymkomplexes Pyruvat-Dehydrogenase. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			aerob	anaerob
BLi02131		putatives Aktivierungsenzym der Pyruvat-Formiat-Lyase		-8,97
BLi02132		putative Formiat-Acetyltransferase		-8,16
BLi01674	<i>pdhA</i>	Pyruvat-Dehydrogenase (Untereinheit)		0,42
BLi01675	<i>pdhB</i>	Pyruvat-Dehydrogenase (Untereinheit)		0,40
BLi01676	<i>pdhC</i>	Pyruvat-Dehydrogenase (Untereinheit)		0,90
BLi01677	<i>pdhD</i>	Pyruvat-Dehydrogenase / 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (Untereinheit)		0,53

Im Gegensatz hierzu fehlt *B. subtilis* dieses Gen und verwendet an dessen Stelle den Multienzymkomplex der Pyruvat-Dehydrogenase für ein sehr schwach ausgeprägtes fermentatives Wachstum (Nakano et al., 1997). Die durchgeführten Transkriptionsanalysen ergaben für DSM13, dass sowohl der ORF der putativen Pyruvat-Formiat-Lyase (BLi02132), als auch der angrenzende ORF des putativen Aktivierungsenzyms (BLi02131) unter anaeroben Wachstumsbedingungen eine signifikant erhöhte Expression zeigten. Für die Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase kodierenden Gene (BLi01674 - BLi01677) konnte hingegen keine starke Änderung des Expressionsverhältnisses beobachtet werden (Tab. 4.7).

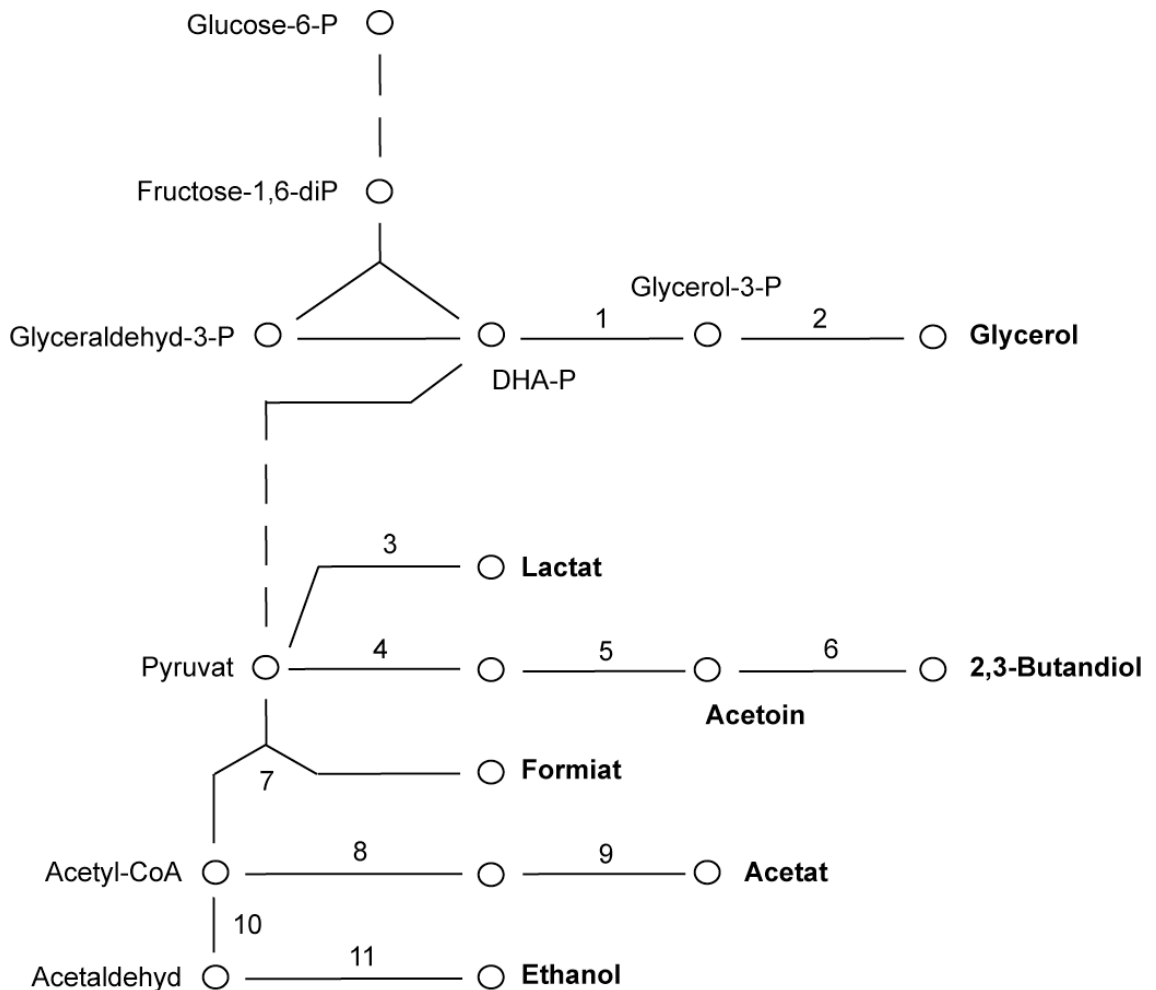


Abbildung 4.6: Schematische Übersicht möglicher Fermentationsprodukte von *B. licheniformis* DSM13. 1, Glycerol-Dehydrogenase; 2, Glycerophosphatase; 3, Lactat-Dehydrogenase; 4, α -Acetolactat-Synthase; 5, α -Acetolactat-Decarboxylase; 6, Acetoin-Reduktase; 7, Pyruvat-Formiat Lyase; 8, Phosphotransacetylase; 9, Acetat-Kinase; 10, Acetaldehyd-Dehydrogenase; 11, Alkohol-Dehydrogenase; DHA-P – Dihydroxyaceton-Phosphat

Tabelle 4.8: Expressionsverhältnisse von Genen, welche im Zusammenhang mit der Bildung von Fermentationsendprodukten stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Werte, die mit einem Stern versehen sind, erfüllen nicht vollständig die Kriterien zur Ermittlung der Expressionsverhältnisse wie unter 3.8.6. beschrieben. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse aerob / anaerob
BLi00366	<i>ldh</i>	Lactat-Dehydrogenase	-3,94*
BLi00367	<i>lctP</i>	Lactat-Permease	-4,12*
BLi02066		putative Acetoin-Reduktase	-4,08
BLi02132		putative Formiat-Acetyltransferase	-8,16
BLi03086	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase	1,82
BLi03847	<i>alsD</i>	α -Acetolactat-Decarboxylase	-2,73
BLi03848	<i>alsS</i>	α -Acetolactat-Synthase	-4,08
BLi03849	<i>alsR</i>	transkriptionaler Regulator des α -Acetolactat-Operons	-0,60
BLi03997	<i>pta</i>	Phosphotransacetylase	1,86

Wie bereits eben erläutert, ist die Pyruvat-Formiat-Lyase an der Bildung von Formiat beteiligt. Dieses ist eines der Produkte, welches mittels NMR-Spektroskopie im Zusammenhang mit der Fermentation von *B. licheniformis* identifiziert wurde (Shariati et al., 1995). Weitere in dieser Publikation beschriebene Produkte sind unter anderem Acetat, 2,3-Butandiol, Ethanol, Glycerol und Lactat. Anhand der in Tabelle 4.8 dargestellten Expressionsverhältnisse kann man erkennen, dass Gene, welche an der Bildung von Fermentationsendprodukten beteiligt sind, eine Induktion unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu aeroben Wachstumsbedingungen zeigten. Dazu gehören das Gen der Lactat-Dehydrogenase (*ldh*), welche die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat katalysiert (Abb. 4.6). Im Genom von DSM13 direkt daneben lokalisiert ist das Gen der Lactat-Permease (*lctP*). Dieses war ebenfalls unter anaeroben Wachstumsbedingungen induziert. Des Weiteren sind die Gene *alsS* und *alsD* zu nennen. Diese kodieren für die α -Acetolactat-Synthase (*alsS*) und α -Acetolactat-Decarboxylase (*alsD*), welche an der Bildung von Acetoin beteiligt sind. Für das Gen des zugehörigen transkriptionalen Repressors, *alsR*, konnte hingegen keine erhöhte Änderung des Expressions-

verhältnisses ermittelt werden. Der ORF BLi02066 kodiert für eine putative Acetoin-Reduktase (EC 1.1.1.5), welche die Reduktion von Acetoin zu 2,3-Butandiol katalysiert. Wie schon die Gene, die an der Bildung von Acetoin beteiligt sind (*alsSD*), so konnte auch für diesen ORF eine erhöhte Expression beim Wachstum unter anaeroben Bedingungen beobachtet werden. Gene, welche an der Bildung von Acetat involviert sind, namentlich *pta* und *ackA*, waren hingegen unter anaeroben Wachstumsbedingungen reprimiert.

Tabelle 4.9: Expressionsverhältnisse von Genen, welche im Zusammenhang mit dem Fermentationsendprodukt Glycerol stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Funktion	log Expressionsverhältnisse aerob / anaerob
BLi00828	<i>gldA</i>	putative Glycerol-Dehydrogenase	1,11
BLi00993	<i>glpP</i>	transkriptionaler Antiterminator und Kontrolle der mRNA Stabilität von <i>glpD</i>	1,11
BLi00994	<i>glpF</i>	Unterstützung der Glycerol- Aufnahme	0,49
BLi00995	<i>glpK</i>	Glycerol-Kinase	0,32
BLi00996	<i>glpD</i>	Glycerol-3-Phosphat- Dehydrogenase	-2,78
BLi02420	<i>gpsA</i>	NAD(P)H abhängige Glycerol-3- Phosphat-Dehydrogenase	-0,27
BLi04259		putative Glycerol-1-Phosphat- Dehydrogenase	-4,88
BLi04260	<i>ykrX</i>	YkrX / putative D- α -Glycerophosphatase	-4,28

Ein einleitender Schritt zur Bildung von Glycerol als Fermentationsendprodukt kann durch eine Dehydrogenasereaktion ausgehend vom Dihydroxyaceton-Phosphat katalysiert werden (Abb. 4.6). Im Genom von DSM13 konnten vier Gene identifiziert

werden, dessen Produkt in Verbindung mit Glycerol-Dehydrogenasen annotiert wurde (Tab. 4.9). Beim Wachstum unter anaeroben Kultivierungsbedingungen konnten nur für die ORFs BLi00996 und BLi04259 eine erhöhte Expression im Vergleich zum aeroben Wachstum beobachtet werden. Im Genom von DSM13 ist der ORF BLi00996 (*glpD*) mit Genen (*glpPfk*) assoziiert, welche mit der Verwertung von Glycerol in Verbindung stehen. Für diese Gene konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine signifikante Änderung des Expressionsverhältnisses beobachtet werden (Tab. 4.9). Anders hingegen das in direkter Nachbarschaft zum ORF BLi04259 lokalisierte Gen *ykrX* (BLi04260). Dieses zeigte eine erhöhte Expression unter anaeroben Wachstumsbedingungen. Über UniProtKB/TrEMBL (Q65CZ1_BACLD) konnte dessen Produkt als putative D- α -Glycerophosphatase ermittelt werden.

Tabelle 4.10: Expressionsverhältnisse von Genen, welche im Zusammenhang mit Alkohol-Dehydrogenasen stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. n.b. - nicht bestimmt, put. - putativ

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse aerob / anaerob
BLi00509	<i>ydaD</i>	ähnl. zur Alkohol-Dehydrogenase	n.b.
BLi00992	<i>yogaA</i>	ähnl. zur Alkohol-Dehydrogenase	-0,04
BLi01117	<i>yhxC</i>	ähnl. zur Alkohol-Dehydrogenase	-3,97
BLi01355	<i>yjmD</i>	ähnl. zur Alkohol-Dehydrogenase	0,51
BLi02097	<i>adhA</i>	NADP abhängige Alkohol- Dehydrogenase	-0,71
BLi03269	<i>gbsB</i>	Alkohol-Dehydrogenase	-0,21
BLi03502		putative Alkohol-Dehydrogenase	n.b.
BLi03831	<i>adhB</i>	Alkohol-Dehydrogenase	-1,04
BLi04290		put. Alkohol-Dehydrogenase / Acetaldehyd-Dehydrogenase	-7,97

Wie in der Abbildung 4.6 beschrieben kann die Umsetzung zu Ethanol, beginnend vom Acetyl-CoA, durch die Enzyme Acetaldehyd-Dehydrogenase und Alkohol-Dehydrogenase erfolgen. Untersuchungen in *E. coli* haben gezeigt, dass diese

beiden Reaktionen auch durch eine Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1) katalysiert werden kann (Goodlove et al., 1989). Im Zusammenhang mit der Acetaldehyd-Dehydrogenase bzw. Alkohol-Dehydrogenase konnten in DSM13 neun ORFs identifiziert werden (Tab. 4.10). Nur für zwei von ihnen wurde eine erhöhte Expression beim anaeroben Wachstum beobachtet. Im einzelnen sind dieses der ORF BLi01117, dessen Produkt Ähnlichkeit mit einer Alkohol-Dehydrogenase aufweist und der ORF BLi04290, welcher wiederum für eine putative Alkohol- bzw. Acetaldehyd-Dehydrogenase kodiert. Ein für den letztgenannten ORF durchgeführter Sequenzvergleich durch BLAST auf Aminosäureebene ergab eine mehr als 50%ige Übereinstimmung mit dem Alkohol-Dehydrogenase-Enzym AdhE aus *E. coli* K12 (Daten nicht gezeigt).

4.1.2.2. Verifizierung ausgewählter Daten der DNA-Microarray-Experimente durch *real-time* RT-PCR

Für einige ausgewählte Gene sollten die mit dem DNA-Microarray beobachteten Expressionsdaten durch eine zweite Methode verifiziert werden. Zur Validierung der Daten wurde die *real-time* RT-PCR herangezogen. Wie für die DNA-Microarray-Analysen wurde auch für die Analyse mittels *real-time* RT-PCR die RNA aus *B. licheniformis* Zellen in je zwei unabhängigen Kultivierungen unter anaeroben bzw. aeroben Wachstumsbedingungen gewonnen. Die sich anschließenden Experimente bestätigten die bereits ermittelten Daten. So konnten für Gene, welche in Verbindung mit der Bildung von Fermentationsendprodukten, wie *ldh*, *alsD* oder aber auch BLi02132 eine gesteigerte Expression unter anaeroben Wachstumsbedingungen beobachtet werden (Tab. 4.11). Gleiches konnte für den ORF der anaeroben Ribonukleotidreduktase beobachtet werden. Auch für das Gen der zweiten Untereinheit der Cytochrom *bd* Ubiquinol Oxidase (*cydB*) bzw. der putativen Methyloconit-Hydratase (*mmgE*) konnte die Induktion unter anaeroben Kultivierungsbedingungen bestätigt werden. Letzteres Enzym steht im Zusammenhang mit dem Methylcitratzyklus. Hierauf wird zu einem späteren Zeitpunkt in Kapitel 4.6 näher eingegangen. Auf der anderen Seite konnte auch mittels *real-time* RT-PCR, wie auch schon bei den vergleichenden Genexpressionsanalysen der DNA-Microarrays eine Reprimierung für das Gen der Acetat-Kinase, *ackA*, wie auch für das Gen *sdhB*,

welches für eine Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase kodiert, unter anaeroben Wachstumsbedingungen gezeigt werden.

Tabelle 4.11: Vergleich der durch DNA-Microarrays und *real-time* RT-PCR ermittelten Expressionsverhältnisse für ausgewählte Gene. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Werte, die mit einem Stern versehen sind, erfüllen nicht vollständig die Kriterien zur Ermittlung der Expressionsverhältnisse wie unter 3.8.6. beschrieben. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. put. - putativ

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			aerob / anaerob	
			DNA- Microarray	<i>real-time</i> RT-PCR
BLi00366	<i>ldh</i>	Lactat-Dehydrogenase	-3,94*	-5,77
BLi00996	<i>glpD</i>	Glycerol-3-Phosphat- Dehydrogenase	-2,78	-4,09
BLi02132		put. Formiat-Acetyltransferase	-8,16	-12,53
BLi02660	<i>glck</i>	Glucose-Kinase	-0,08	-0,98
BLi02992	<i>sdhB</i>	Succinat-Dehydrogenase (Untereinheit)	3,07	3,92
BLi03086	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase	1,82	2,30
BLi03824		putative anaerobe Ribonukleotidreduktase	-4,61	-5,47
BLi03847	<i>alsD</i>	α -Acetolactat-Decarboxylase	-2,73	-1,87
BLi04095	<i>mmgE</i>	put. Methyloconitat-Hydratase	-2,74	-2,08
BLi04133	<i>cydB</i>	Cytochrom <i>bd</i> Ubiquinol-Oxidase (Untereinheit)	-5,47	-5,95

4.1.3. Bestimmung von Fermentationsendprodukten

Die durchgeführten Transkriptionsanalysen zeigten eine Induktion von Genen unter anaeroben Wachstumsbedingungen, welche im Zusammenhang mit der Bildung von Fermentationsendprodukten stehen. Anders als bei Shariati et al. (1995) beschrieben erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Analyse von Kulturüberständen

mittels Ionenchromatographie (3.9.2.). Hierzu wurden während des Wachstumsverlaufs zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots von 0,5 ml der Kultur entnommen, gekühlt abzentrifugiert und der Kulturüberstand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Als Hauptfermentationsprodukte von DSM13 beim anaeroben Wachstum in einem definierten Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle konnten 2,3-Butandiol und Formiat identifiziert werden (Abb. 4.7). Anders als bei Formiat war erst nach einem Verbrauch von etwa 10 mM Glucose eine Zunahme der Konzentration von 2,3-Butandiol im Kulturüberstand zu beobachten. Dieses ging einher mit der qualitativen Bestimmung von Acetoin, welche nach der unter 3.9.5. beschriebenen Methode erfolgte. Daneben konnte noch Glycerol und Lactat im Kulturüberstand bestimmt werden. Eine erhöhte Zunahme von Glycerol konnte jedoch erst mit dem Einschwenken in die stationäre Phase beobachtet werden. Der Nachweis von Acetat im Kulturüberstand erfolgte zunächst ebenfalls mittels Ionenchromatographie und konnte anschließend durch UV-Tests (3.9.4.) verifiziert werden. Ethanol hingegen wurde qualitativ mittels Gas-Chromatographie (3.9.3.) ermittelt.

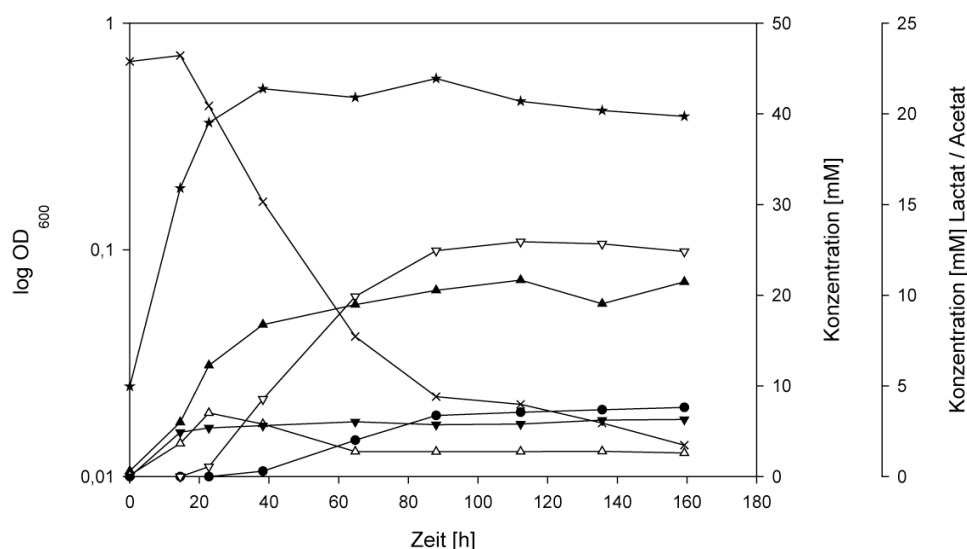


Abbildung 4.7: Wachstumskurve von DSM13 in einem definierten Medium unter anaeroben Kultivierungsbedingungen. Dargestellt ist neben dem Wachstum von DSM13 (★) und den Verbrauch von Glucose (x), die Akkumulation von Fermentationsendprodukten im Kulturüberstand wie Formiat (▲), 2,3-Butandiol (▽), Glycerol (●), Lactat (▼) und Acetat (△). Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

4.2. Untersuchungen zur Verwertung von C2-Metaboliten

Die Thematik der Assimilation von C2-Einheiten durch DSM13 wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls erneut aufgegriffen. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits anhand von Wachstumsversuchen und Transkriptionsanalysen gezeigt werden, dass *B. licheniformis* DSM13 vermutlich durch den Glyoxylatzyklus zum Wachstum auf Acetat und 2,3-Butandiol befähigt ist (vgl. Schmidt, 2005 und Veith, 2004). Es konnten im Rahmen der Genomanalyse von DSM13 zwei Gene identifiziert werden, welche starke Homologie zur Isocitrat-Lyase (BLi04207, Sandeman et al., 1991) und der Malat-Synthase (BLi04208, Sharma et al., 2000) aufweisen. Gemeinsam mit weiteren Enzymen des Tricarbonsäurezyklus bilden sie den Glyoxylatzyklus. Wie bereits im Kapitel zum fermentativen Wachstum von DSM13 angesprochen, sollte auch bei dieser Thematik eine Reproduktion der Transkriptionanalysen mit Oligo-basierenden DNA-Microarrays erfolgen. Die vergleichenden Genexpressionsanalysen hierzu wurden anhand von jeweils 2 Hybridisierungen ausgewertet. Eine als signifikant eingestufte Änderung des Expressionverhältnisses um mindestens den Faktor 3 entspricht Werten von 1,5849 bzw. $-1,5849$, da die gezeigten Expressionsdaten logarithmisch zur Basis 2 dargestellt sind. Bei den im Weiteren dargestellten Transkriptionsanalysen zur Verwertung von C2-Metaboliten entsprechen Werte größer 1 einer erhöhten Expression beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol, Werte kleiner -1 hingegen unter Referenzbedingungen.

4.2.1. Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle

Im Zusammenhang mit den Transkriptionsanalysen wurde DSM13 in einem definierten Medium mit 60 mM Acetat in einem Schüttelkolben bei 42°C angezogen. Unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots des Kulturüberstandes entnommen und wie bereits unter 4.1.3. beschrieben behandelt. Mittels Ionenchromatographie konnte im Anschluss der Verbrauch des Acetats detektiert werden (Abb. 4.8).

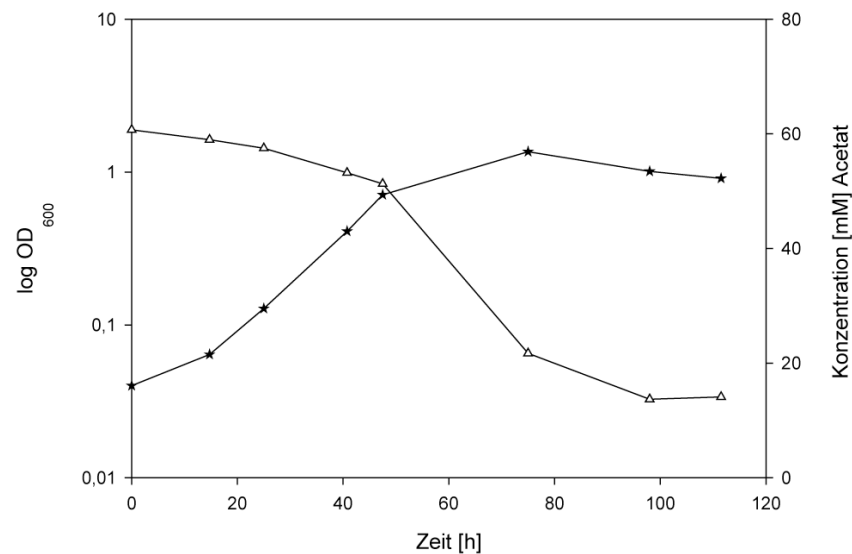


Abbildung 4.8: Wachstumsverlauf von DSM13 in einem definierten Medium mit 60 mM Acetat als Kohlenstoffquelle. Dargestellt ist das Wachstum von DSM13 (★) und der Verbrauch von Acetat (△) über die Zeit. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

4.2.2. Transkriptionsanalysen zum Wachstum mit Acetat

Zur Isolation von RNA aus *B. licheniformis* Zellen für die Transkriptionsanalysen wurden 100 ml Batch-Kulturen der auf Acetat gewachsenen Zellen in jeweils zwei biologisch unabhängigen Experimenten in der mittleren logarithmischen Phase bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 geerntet. Die Anzucht für die Referenzbedingung der Transkriptionsanalysen erfolgte im Chemostaten mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle wie unter 3.3.5. beschrieben.

Expression der Gene des Zentralstoffwechsels

Zunächst lag das Augenmerk der Transkriptionsanalysen auf den Tricarbonsäure- bzw. Glyoxylatzyklus. Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse für den Tricarbonsäurezyklus sind in Abbildung 4.9, eine Übersicht der beteiligten Gene und deren Erläuterung in der Tabelle 4.12 dargestellt.

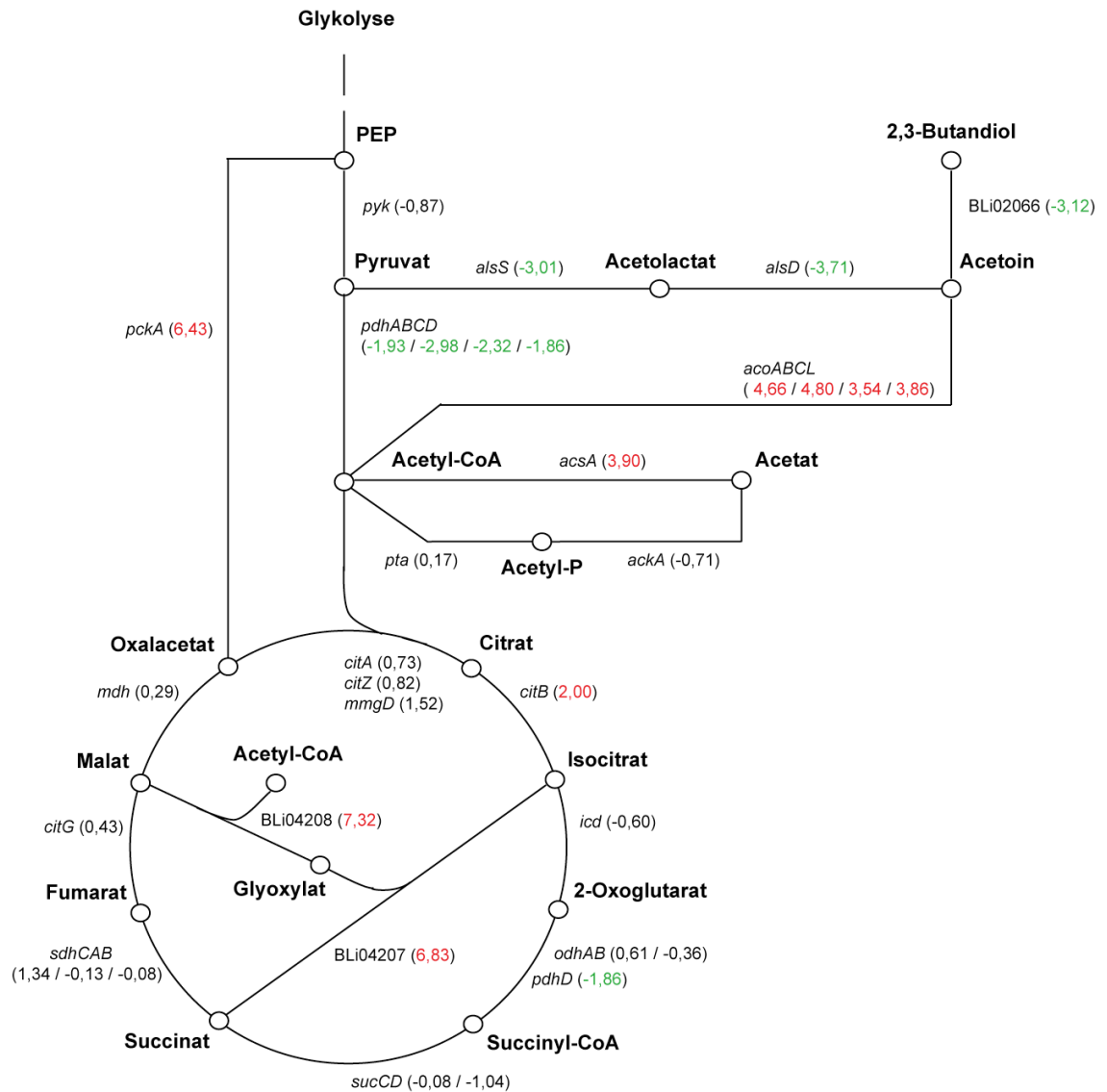


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Tricarbonsäure- und Glyoxylatzyklus.

Angegeben sind die Expressionsverhältnisse der beteiligten Gene bei Wachstum mit Acetat im Vergleich zum Wachstum mit Glucose. Werte größer als 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Acetat dar, kleiner -1 hingegen unter der Referenzbedingung. Die gezeigten Daten sind logarithmisch dargestellt und repräsentative Einzelmessungen.

Tabelle 4.12: Gen- bzw. ORF-Bezeichnungen und Funktionen der in den Abbildungen 4.9 und 4.12 dargestellten Gene des Tricarbonsäurezyklus.

Gen / ORF	Funktion
<i>ackA</i>	Acetat-Kinase
<i>acoABCL</i>	Untereinheiten der Acetoin-Dehydrogenase
<i>acsA</i>	Acetyl-CoA-Synthetase
<i>alsD</i>	α -Acetolactat-Decarboxylase
<i>alsS</i>	α -Acetolactat-Synthase
BLi02066	putative Acetoin-Reduktase
BLi04207	Isocitrat-Lyase
BLi04208	Malat-Synthase
<i>citA</i>	Citrat-Synthase I
<i>citB</i>	Aconitat-Hydratase
<i>citG</i>	Fumarat-Hydratase
<i>citZ</i>	Citrat-Synthase II
<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase
<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase
<i>mmgD</i>	Citrat-Synthase III
<i>odhAB</i>	Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
<i>pdhABC</i>	Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase
<i>pdhD</i>	Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase / Untereinheit der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
<i>pta</i>	Phosphotransacetylase
<i>pyk</i>	Pyruvat-Kinase
<i>sdhCAB</i>	Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase
<i>sucCD</i>	Untereinheiten der Succinyl-CoA-Synthetase

Im Vergleich zum Wachstum mit Glucose zeigten *B. licheniformis* Zellen beim Wachstum mit Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle unter anderem eine Erhöhung der Expression für das Gen *acsA*. Dieses kodiert für die Acetyl-CoA-Synthetase, welche essentiell für die Verwertung von Acetat ist. Daneben konnte noch eine erhöhte Expression für das Gen der Aconitat Hydratase (*citB*) beobachtet werden, welche die

Umsetzung von Citrat zu Isocitrat katalysiert. Letzteres kann zum einen über 2-Oxoglutarat zu Succinat oder direkt zu Succinat umgewandelt werden. Katalysiert wird die Umsetzung von Isocitrat zu Succinat unter Bildung von Glyoxylat durch die Isocitrat-Lyase (BLi04207), einem der Enzyme des Glyoxylatzyklus. Das zweite Enzym, die Malat-Synthase (BLi04208) katalysiert die Kondensation des Glyoxylats mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu Malat. Für beide ORFs, sowohl BLi04207, als auch BLi04208, konnte eine signifikant erhöhte Expression beim Wachstum mit Acetat im Vergleich zum Wachstum mit Glucose beobachtet werden. Ebenfalls eine starke Erhöhung konnte in diesem Kontext für das Gen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pckA*) beobachtet werden, welches durch die Umsetzung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat (PEP) letzteres für die Gluconeogenese bereitstellt. Eine Repression von Genen beim Wachstum mit Acetat im Vergleich zum Wachstum mit Glucose konnte hingegen für die Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase kodierenden Gene (*pdhABCD*) beobachtet werden. Gleiches zeigte sich für die Gene der α -Acetolactat-Synthase (*alsS*) und α -Acetolactat-Decarboxylase (*alsD*), welche an der Synthese von Acetoin beteiligt sind. Der ORF der putativen Acetoin-Reduktase (BLi02066) war ebenfalls beim Wachstum mit Acetat reprimiert.

Im Gegensatz dazu waren die Gene, welche im Zusammenhang mit der Verwertung von Acetoin stehen beim Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle induziert. Dieses sind die für die Untereinheiten der Acetoin-Dehydrogenase kodierenden Gene *acoABCL*. Direkt angrenzend im Genom liegt das Gen des zugehörigen transkriptionalen Aktivators *acoR* (Abb. 4.10). Auch für dieses konnte eine erhöhte Expression ermittelt werden (Tab. 7. 2 im Anhang). Begrenzt werden diese Gene von dem ORF BLi00848, welcher für eine putative Protease kodiert und dem Gen *yjfF*. Die Funktion des Produktes von letzterem ist bisher unbekannt.

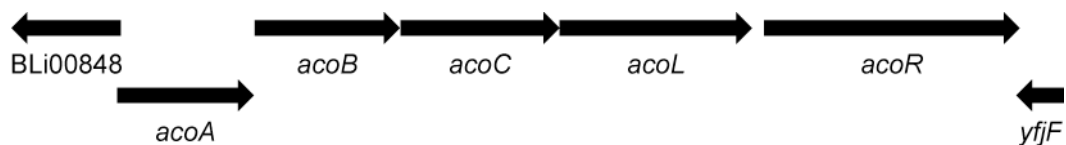


Abbildung 4.10: Genregion des *aco*-Operons von *B. licheniformis* DSM13. Erläuterung im Text.

Expressionsdaten anderer Enzyme

Anhand der durchgeführten DNA-Microarray-Analysen konnte für insgesamt 146 Gene eine signifikante Änderung des Expressionsverhältnisses beim Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle ermittelt werden. Darunter befinden sich 44 putative bzw. hypothetische Gene und 43 Y-ORFs. Den verbleibenden 59 Genen konnte während der Annotation eine Funktion zugewiesen werden. Neben Genen, welche in die Purin-Biosynthese involviert sind (*purB*, *purE*, *purK* und *xpt*) konnten Gene identifiziert werden, deren Produkte an den gegenläufigen Prozessen der Differenzierung einer Endospore bzw. ihrer Auskeimung beteiligt sind. Beispielfhaft können in diesem Zusammenhang neben *cotVX* (Proteine der Sporenhülle), *coxA* (Cortexprotein der Spore), die Gene *gerPF*, *gerPE*, *gerPB* und *gerPA* (Keimung der Spore), aber auch *cwlC* (*N*-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase *cwlL* Vorläufer) genannt werden. Ebenfalls eine erhöhte Transkription der Gene beim Wachstum mit Acetat konnte für die Proteine AprX (intrazelluläre alkalische Serin-Protease), AsnO (Asparagin-Synthetase), CstA (bei Kohlenstoffmangel induziertes Protein), DhaS (Aldehyd-Dehydrogenase), IspA (intrazelluläre Serine-Protease) und PyrB (Aspartat-Carbamoyltransferase) beobachtet werden.

4.2.3. Wachstum mit 2,3-Butandiol als Kohlenstoffquelle

Wie auch schon bei den Untersuchungen zum Wachstum mit Acetat, erfolgten die Kultivierungen mit 30 mM 2,3 Butandiol als Kohlenstoffquelle in einem definierten Medium im Schüttelkolben bei 42°C. Analysen der Kulturüberstände, von denen Aliquots im Verlauf des Wachstums über die Zeit entnommen wurden, ergaben eine zwischenzeitliche Anhäufung und Verbrauch von Acetoin. Die Experimente lassen vermuten, dass DSM13 2,3-Butandiol zunächst zu Acetoin umsetzt, letzteres wieder zur Bildung von Zellmasse verstoffwechselt und erst im Anschluss daran 2,3 Butandiol weiter verwertet (Abb. 4.11).

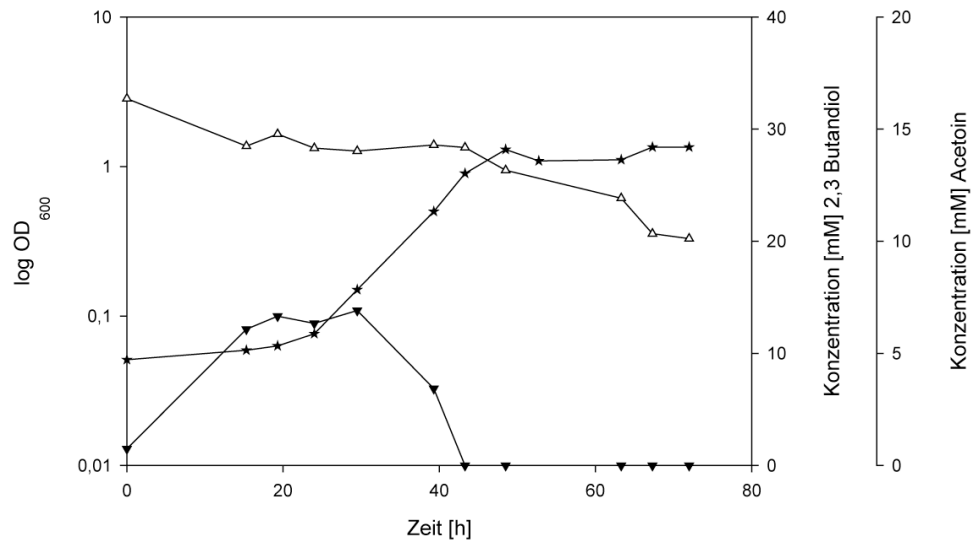


Abbildung 4.11: Wachstumsverlauf von DSM13 in einem definierten Medium mit 30 mM 2,3-Butandiol. Dargestellt ist das Wachstum von DSM13 (★) und der Verbrauch von 2,3-Butandiol (Δ) mit zwischenzeitlicher Anhäufung und Verbrauch von Acetoin (▼) über die Zeit. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

4.2.4. Transkriptionsanalysen zum Wachstum mit 2,3-Butandiol

Die Transkriptionsanalyse von *B. licheniformis* für den Vergleich des Wachstums mit 2,3-Butandiol und Glucose wurde analog der Untersuchungen mit Acetat und Glucose vorgenommen. Die aus zwei biologisch unabhängigen Experimenten stammende RNA wurde ebenfalls in der mittleren logarithmischen Phase von 100 ml Batch-Kulturen gewonnen. Auch bezüglich der Datenauswertung wurde wie bei der vergleichenden Expressionsanalyse des Wachstums mit Acetat und Glucose verfahren.

Expression der Gene des Zentralstoffwechsels

Wie schon bei den Transkriptionsanalysen zum Wachstum mit Acetat, so lag auch hier zunächst das Augenmerk auf den Tricarbonsäure- bzw. Glyoxylatzyklus. Interessanterweise konnte beim Wachstum mit 2,3-Butandiol ein Expressionsmuster, ähnlich zum Wachstum mit Acetat beobachtet werden (Abb. 4.12).

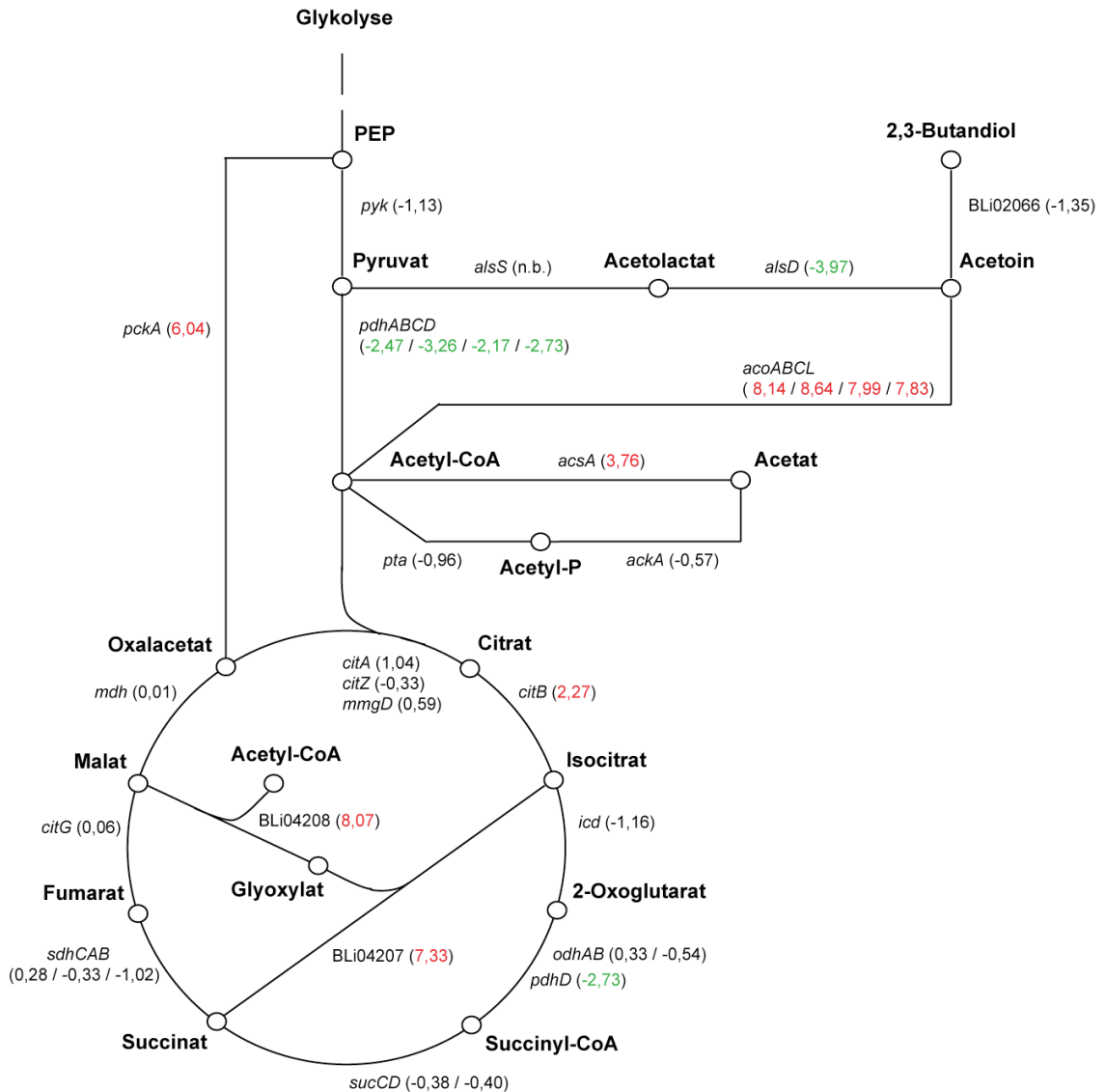


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung des Tricarbonsäure- und Glyoxylatzyklus.

Angegeben sind die Expressionsverhältnisse der beteiligten Gene bei Wachstum mit 2,3-Butandiol im Vergleich zum Wachstum mit Glucose. Werte größer als 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit 2,3-Butandiol dar, kleiner -1 hingegen unter der Referenzbedingung. Die gezeigten Daten sind logarithmisch dargestellt und repräsentative Einzelmessungen. n.b. – nicht bestimmt

Die kodierenden Gene des Multienzymkomplexes der Pyruvat-Dehydrogenase (*pdhABCD*) waren beim Wachstum mit 2,3-Butandiol im Vergleich zum Wachstum mit Glucose reprimiert. Gleiches konnte für das Gen der α -Acetolactat-Decarboxylase (*alsD*), welche die abschließende Reaktion zur Synthese von Acetoin katalysiert, beobachtet werden. Die Acetoin-Reduktase setzt im Weiteren Acetoin zu 2,3-Butandiol

um. Für den zugehörigen ORF BLi02066 konnte ebenfalls eine gesenkte Expression ermittelt werden. Eine erhöhte Expression im Zusammenhang mit dem Wachstum auf 2,3-Butandiol konnte wiederum für das Gen der Aconitat-Hydratase (*citB*), der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pckA*), wie auch für die Gene des Glyoxylatzyklus, der Isocitrat-Lyase (BLi04207) und der Malat-Synthase (BLi04208) bestimmt werden. Ebensolches gilt für die Gene *acoABCL*, welche für die Untereinheiten der Acetoin-Dehydrogenase kodieren, aber auch für das Gen *acoR* des zugehörigen transkriptionalen Aktivators (Tab. 7.2 im Anhang).

Expressionsdaten anderer Enzyme

Steht *B. licheniformis* Zellen nur 2,3-Butandiol als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung, so konnte für 77 ORFs eine signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zu Glucose gewachsenen Zellen ermittelt werden. Hierunter befinden sich 28 hypothetische bzw. putative Gene und 17 Y-ORFs. Den verbleibenden 32 Genen konnte eine Funktion zugewiesen werden. Wie bereits beim Wachstum mit Acetat zu beobachten war, so sind auch beim Wachstum mit 2,3-Butandiol Gene zu finden, deren Produkte an der Differenzierung bzw. Auskeimung der Endospore beteiligt sind. Neben den Genen *cotVXY* (Proteine der Sporenhülle) können unter anderem die Gene *gerPC*, *gerPB* und *gerPA* (Keimung der Spore) und *cwlC* (*N*-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase *cwlL* Vorläufer) angeführt werden. Eine gesteigerte Expression konnte ebenfalls für *aprX* (intrazelluläre alkalische Serin-Protease), *cstA* (bei Kohlenstoffmangel induziertes Protein), *dhaS* (Aldehyd-Dehydrogenase) und *ispA* (intrazelluläre Serin-Protease) beobachtet werden. Daneben wurden noch die kodierenden Gene der Proteine FhuD (Ferrichrom ABC-Transporter), LcfA (beteiligt am Fettsäurestoffwechsel) GlpF und GlpK (involviert in die Verwertung von Glycerol) erhöht transkribiert.

4.3. Untersuchungen zur Verwertung von Aminosäuren

Die Verwertung von Zuckern durch Mikroorganismen ist in der Literatur gut beschrieben. Wenig hingegen ist über die Verwertung von Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle bekannt. Diese Thematik aufgreifend sollen nun im folgenden Wachstumsdaten, Transkriptionsanalysen und Ergebnisse der Ionenchromatographie zur Verwertung von Aminosäuren dargestellt werden. Zunächst soll hierbei auf die Verwertung einzelner Aminosäuren eingegangen werden. Im Anschluss daran werden Untersuchungen zur Verwertung von Gemischen von Aminosäuren erläutert.

4.3.1. Wachstum mit einzelnen Aminosäuren

4.3.1.1. Verwertung einzelner Aminosäuren als Wachstumskomponenten

Um die Verwertung von Aminosäuren als Wachstumskomponenten durch DSM13 zu untersuchen, wurde dieser in einem definierten Medium mit einzelnen Aminosäuren angezogen (vgl. 3.2.2.). Diese Wachstumsexperimente zeigten, dass sieben von 18 proteinogenen Aminosäuren sowohl als Stickstoff-, als auch als Kohlenstoffquelle dienen können. Im Einzelnen sind dies L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Glutamin, L-Glutamat und L-Prolin (Tab. 4.13). Wachstumsversuche mit L-Cystein als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle konnten nicht durchgeführt werden, da Komponenten des Mediums bei der benötigten Wachstumstemperatur ausfielen. L-Tyrosin lässt sich nicht in ausreichender Konzentration in Wasser lösen, so dass auch bei dieser Aminosäure kein Wachstum bestimmt werden konnte. Im Rahmen der Wachstumsexperimente proteinogener Aminosäuren wurde ebenfalls die nicht-proteinogene Aminosäure L-Ornithin als Wachstumskomponente untersucht. Diese Experimente ergaben, dass DSM13 auch diese Aminosäure als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nutzen kann (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.13: Überprüfung von proteinogenen Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle.

Die Kultivierungsexperimente erfolgten in einem definierten Medium wie unter 3.2.2. beschrieben. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 50 Stunden beobachtet. + Wachstum, - kein Wachstum, n.b. - nicht bestimmt

Aminosäure	Konzentration	Wachstum
L-Alanin	30 mM	+
L-Arginin	30 mM	+
L-Asparagin	30 mM	+
L-Aspartat	30 mM	+
L-Cystein	30 mM	n.b.
L-Glutamin	30 mM	+
L-Glutamat	30 mM	+
Glycin	30 mM	-
L-Histidin	30 mM	-
L-Isoleucin	30 mM	-
L-Leucin	30 mM	-
L-Lysin	30 mM	-
L-Methionin	30 mM	-
L-Phenylalanin	30 mM	-
L-Prolin	30 mM	+
L-Serin	30 mM	-
L-Threonin	30 mM	-
L-Tryptophan	30 mM	-
L-Tyrosin	30 mM	n.b.
L-Valin	30 mM	-

4.3.1.2. Transkriptionsanalysen zur Verwertung einzelner Aminosäuren

Nach der Beobachtung, welche Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können, wurden Transkriptionsanalysen zu diesen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Für das Design des Experiments wurde hierbei die Methode der *common reference* gewählt (Ehrenreich, 2006). Bei Genexpressionsanalysen werden in der Regel die relativen Expressionsstärken zweier Proben miteinander verglichen. Bei diesen Proben handelt es sich um RNA, welche aus Zellen

gewonnen wird, die zum einen unter Referenzbedingungen und zum anderen unter den experimentell zu untersuchenden Bedingungen gewachsen sind. Als Referenzbedingung sollte eine Bedingung gewählt werden, welche schnell reproduzierbar ist und bei der Zellen zur RNA-Präparation in großen Mengen verfügbar sind. In dieser Arbeit wurde DSM13 deshalb, sofern nicht anders angegeben, im Chemostaten in einem definierten Medium mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert (vgl. 3.3.5.). Ein Vorteil dieser Methode der *common reference* ist zum einen, dass die experimentell zu untersuchenden Bedingungen direkt miteinander vergleichbar sind und zum anderen, dass ein so genannter *dye-flip*, eine Umkehrung der Markierungsreaktion, nicht mehr notwendig ist. Analog der bereits in vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Durchführung wurden die vergleichenden Genexpressionsanalysen anhand von jeweils 2 Hybridisierungen ausgewertet. Aufgrund der logarithmisch zur Basis 2 dargestellten Expressionsdaten entspricht eine als signifikant eingestufte Änderung des Expressionverhältnisses um mindestens den Faktor 3 Werten von 1,5849 bzw. -1,5849.

4.3.1.2.1. Einmünden der Aminosäuren in den Zentralmetabolismus

Zunächst lag der Focus der Untersuchungen auf den zentralen Stoffwechselwegen. Die Abbildung 4.13 zeigt das Einmünden verschiedener Aminosäuren in den Zentralmetabolismus. In Tabelle 4.14 sind die Expressionswerte von Genen dargestellt, welche im Zusammenhang mit dem Abbau der Aminosäuren stehen, die DSM13 als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nutzen kann.

L-Alanin

L-Alanin wird durch die L-Alanin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.1) zu Ammoniak und Pyruvat, mit NAD^+ als Cofaktor, nach folgender Reaktion umgesetzt:



In DSM13 kodiert das Gen *ald* (BLi03382) für die L-Alanin-Dehydrogenase. Im Genom konnte auch ein homologes Gen (BLi04275) annotiert werden. Beide Gene zeigten beim Wachstum mit L-Alanin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle eine erhöhte

Tabelle 4.14: Darstellung der Expressionsverhältnisse von ORFs, welche im Zusammenhang mit der Verwertung von Aminosäuren stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit der angegebenen Aminosäure, Werte kleiner -1 unter Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen, wobei anzumerken ist, dass Werte mit einem Sternchen nicht durch ein zweites biologisches Experiment bestätigt werden konnten. Orn - Ornithin

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse														
			Ala / Glc	Arg / Glc	Asn / Glc	Asp / Glc	Gln / Glc	Glu / Glc	Pro / Glc	Orn / Glc	Ala / Glc	Arg / Glc	Asn / Glc	Asp / Glc	Gln / Glc	Glu / Glc	Pro / Glc
BLi00198		homolog zur RocF Arginase	1,35	3,54	0,78	1,59	1,99	2,70	1,56	0,68							
BLi00274	<i>ybgJ</i>	ähnlich zur Glutaminase	n.d.	n.d.	3,01*	n.d.	5,31	0,64*	0,63*	n.d.							
BLi00373	<i>ycgM</i>	ähnlich zur Prolin-Oxidase	0,55*	3,44	-1,17*	-0,06	-1,52	-2,17	3,78	5,01							
BLi00374	<i>ycgN</i>	ähnl. Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase	1,28	3,95	-1,40*	-0,06	-0,68	-2,24	3,57	5,16							
BLi00422	<i>rocD</i>	Ornithin-Aminotransferase	1,07	6,10	0,58	1,13	-1,72	0,62	4,44	7,07							
BLi00424	<i>rocF</i>	Arginase	0,72*	5,29	0,77*	1,01*	-0,79*	0,62*	4,87	6,58							
BLi00528	<i>ansB</i>	Aspartase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,02*	n.d.	n.d.	n.d.							
BLi00584		mögliche Arginase	0,40	1,02	0,66	0,18	0,98	0,67	1,33	-0,84							
BLi01514	<i>ykrV</i>	ähnlich zur Aspartat-Aminotransferase	-1,10	-1,17	1,21	0,46	-0,48	-0,58	2,44*	1,57							
BLi01700	<i>ytaM</i>	ähnlich zur Glutaminase	0,46	0,41	-0,79*	-0,23*	-0,09	1,50	0,66	1,07*							
BLi01993	<i>ghnA</i>	Glutamin-Synthetase	-1,97*	-2,60	-0,74	-2,62	-2,52	-3,47	-2,43*	-1,85							
BLi02161	<i>gltB</i>	Glutamat-Synthase (kleine Untereinheit)	0,25	-1,60	-4,66	-3,56	-2,33	-2,43	-2,67	-2,20							
BLi02162	<i>gltA</i>	Glutamat-Synthase (große Untereinheit)	-0,21	-2,83	-4,63	-3,49	-3,47	-2,12	-2,11	-1,99							
BLi02372	<i>aspB</i>	Aspartat-Aminotransferase	-0,42	-0,26	0,33	0,41	-0,03	0,13	0,31	0,79							
BLi02433		mögliche Asparaginase	-0,19	0,47	-0,75	-0,59	0,05	0,24	-0,78	1,37							
BLi02435	<i>gudB</i>	Glutamat-Dehydrogenase (inaktiv)	1,03	0,68	0,46*	0,53*	0,97	0,83*	0,83	1,18							
BLi02777	<i>yccC1</i>	ähnlich zur Asparaginase	0,08	-0,41	0,64*	0,04	-0,22	-0,26	-0,08	0,31*							
BLi02778	<i>yccC2</i>	ähnlich zur Asparaginase	-0,07	0,25	0,19	-0,26*	0,14	-0,23*	-0,13	n.d.							
BLi02964	<i>rocG</i>	Glutamat-Dehydrogenase (major)	0,96*	-1,55*	-0,96*	-2,15	-1,78	-1,69	-1,56	-2,12							
BLi03382	<i>ald</i>	Alanin-Dehydrogenase	3,82	2,64	3,56	-0,57	0,22*	-0,83	1,96	2,44							
BLi03434	<i>yurG</i>	ähnlich zur Aspartat-Aminotransferase	0,03	0,05	0,83	0,54	-0,39	0,36	0,58	0,18							
BLi04139		homolog zur AnsB Aspartase	0,18	0,21	4,67	3,65	0,08	0,40	1,24	0,62							
BLi04140	<i>ansA</i>	Asparaginase	0,87	0,93	5,55	4,67	0,95	1,14	1,14	0,87*							
BLi04163		Arginin-Deiminase	n.d.	0,85*	-1,25	-1,09*	-0,92	-0,47	-0,70*	n.d.							
BLi04164		Ornithin-Carbamoyltransferase	-0,36*	0,55*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							
BLi04237	<i>ywfG</i>	ähnlich zur Aspartat-Aminotransferase	-0,10	-0,61	-1,43	-0,99	-0,29	0,12	0,71	0,72							
BLi04275		homolog zur Ald Alanin-Dehydrogenase	7,41	6,28	8,37	2,72	3,42	2,11	3,57	4,88							

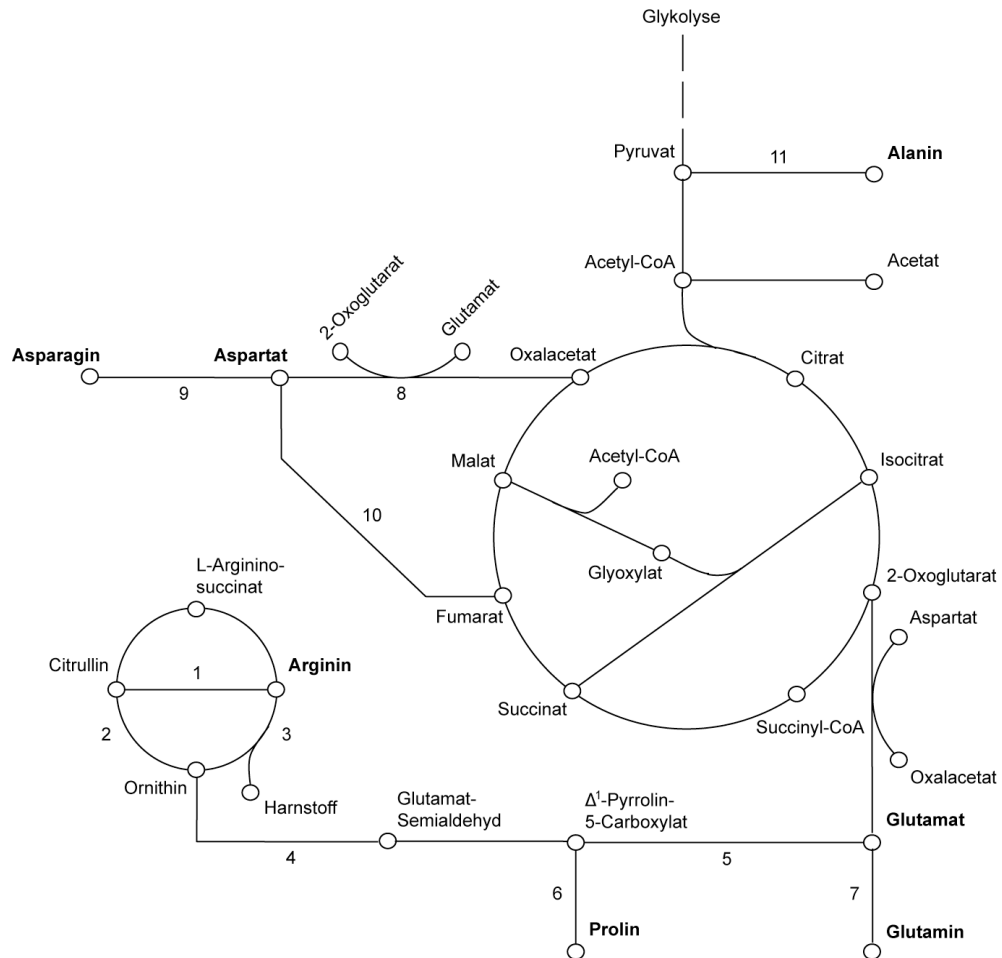


Abbildung 4.13: Einmünden der Aminosäuren in den Zentralmetabolismus.

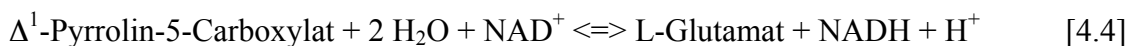
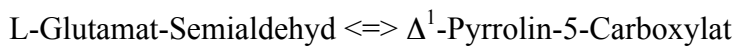
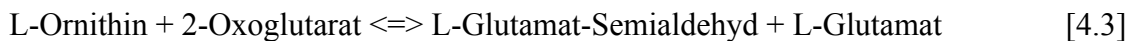
Dargestellt ist der Tricarbonsäurezyklus und der Harnstoffzyklus. Die proteinogenen Aminosäuren sind fett hervorgehoben. 1, Arginin-Deiminase; 2, Ornithin-Carbamoyltransferase; 3, Arginase; 4, Ornithin-Aminotransferase; 5, Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase; 6, Prolin-Oxidase; 7, Glutaminase; 8, Aspartat-Aminotransferase; 9, L-Asparaginase; 10, L-Aspartase; 11, L-Alanin-Dehydrogenase

Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose (Tab. 4.14). Daneben war der ORF BLi03382 ebenfalls beim Wachstum mit L-Asparagin, L-Arginin, L-Prolin und L-Ornithin induziert. Neben der erhöhten Expression beim Wachstum mit L-Alanin konnte auch beim Wachstum mit allen weiteren getesteten Aminosäuren eine erhöhte Expression für den ORF BLi04275 ermittelt werden.

L-Arginin

In *B. licheniformis* sind zwei Wege zum Abbau von L-Arginin bekannt (Cunin et al., 1986). Diese sind nach dem jeweiligen ersten Enzym benannt. Bei dem Arginase

degradativen Pfad wird in einem ersten Schritt L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin umgesetzt [4.2]. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Arginase (EC 3.5.3.1). L-Ornithin wiederum wird durch die Ornithin-Transaminase (EC 2.6.1.13, BLi00422) zu L-Glutamat und L-Glutamat-Semialdehyd umgewandelt [4.3]. Letzteres wird spontan zu Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat, der stabileren zyklischen Form des L-Glutamat-Semialdehyds, umgewandelt. Die anschließende Umwandlung zum L-Glutamat wird durch das Enzym Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (EC 1.5.1.12, BLi00374) katalysiert [4.4].



Im Genom von DSM13 sind drei Gene (BLi00198, BLi00424 und BLi00584) im Zusammenhang mit der Arginase annotiert. Beim Wachstum mit L-Arginin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle zeigten sowohl der ORF BLi00198, als auch BLi00424 eine erhöhte Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose, nicht aber BLi00584 (Tab. 4.14). Bei den weiteren an der Verwertung von L-Arginin beteiligten Genen, BLi00422 und BLi00374, konnte ebenfalls eine erhöhte Expression beobachtet werden. Zusätzlich ist noch anzumerken, dass eines der für die Arginase kodierenden Gene, BLi00424, im Genom von DSM13 mit dem die Ornithin-Aminotransferase kodierenden Gen *rocD* (BLi00422) assoziiert ist. Zwischen diesen ORFs ist das für eine Aminosäurepermease kodierende Gen *rocE* (BLi00423) lokalisiert (Abb. 4.14) Beim Wachstum mit L-Arginin war auch dieses Gen induziert (Tab. 7.3 im Anhang). *Upstream* der Gene *rocDEF* ist das Gen *rocR* (BLi00421) lokalisiert, welches für den zugehörigen transkriptionalen Aktivator kodiert (Abb. 4.14). Des Weiteren konnte für das Gen *rocF* (BLi00424) ebenfalls eine erhöhte Expression beim Wachstum mit L-Prolin und L-Ornithin ermittelt werden. Sowohl für die am weiteren Abbau zum L-Glutamat beteiligten Gene *rocD* (BLi00422) und *ycgN* (BLi00374), als auch für das die Aminosäurepermease kodierenden Gen *rocE* (Tab. 7.3 im Anhang) konnte dieses ebenfalls beobachtet werden (Tab. 4.14).

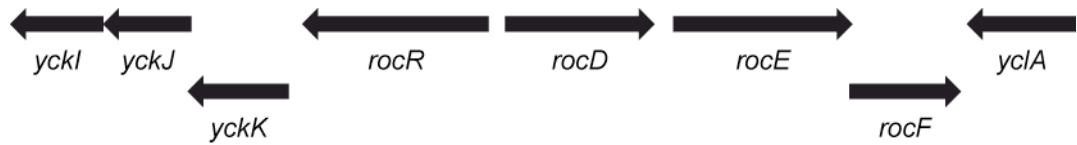


Abbildung 4.14: Genregion, welche im Zusammenhang mit der Verwertung von L-Arginin steht. Erläuterung im Text.

Beim zweiten beschriebenen Weg zum Abbau von L-Arginin wird die einleitende Reaktion von der Arginin Deiminase (EC 3.5.3.6) katalysiert. Dieses Enzym setzt L-Arginin unter Abspaltung von Ammoniak zu L-Citrullin um [4.5]. Letzteres wird durch die Ornithin Carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3) zu L-Ornithin und Carbamoylphosphat umgewandelt [4.6]. Die weiteren Schritte bis zum L-Glutamat entsprechen denen des Abbaus über die Arginase.



Beim Wachstum mit L-Arginin als alleiniger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle konnte weder bei dem die Arginin-Deiminase (BLi04163) kodierenden, noch bei dem für die Ornithin-Carbamoyltransferase (BLi04164) kodierenden Gen, eine erhöhte Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose beobachtet werden (Tab. 4.14). Anzumerken ist hierbei, dass BLi04164 in direkter Nachbarschaft zu dem Gen der Arginin-Deiminase liegt. Ebenfalls dort lokalisiert ist neben dem ORF BLi04162, dessen Produkt homolog zum AhrC Transkriptionsregulator ist, der ORF BLi04166 (Abb. 4.15). Dieser kodiert für eine Carbamat-Kinase, welche unter Bildung von ATP Carbamoylphosphat zu Ammoniak und Kohlendioxid umsetzt.

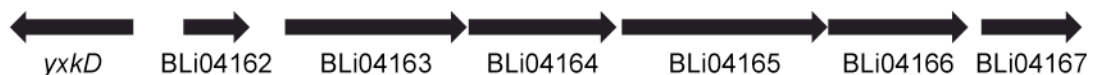
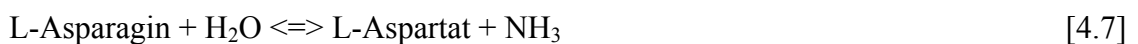


Abbildung 4.15: Genregion um den ORF der Arginin-Deiminase in DSM13. Erläuterung im Text.

L-Asparagin und L-Aspartat

Bei der Verwertung von L-Asparagin wird dieses zunächst in einer Hydrolase-Reaktion, katalysiert durch das Enzym Asparaginase (EC 3.5.1.1), zu L-Aspartat und Ammoniak umgesetzt [4.7]. Anschließend kann L-Aspartat in einem zweiten Schritt durch die Aspartase (EC 4.3.1.1) zu Fumarat und Ammoniak umgewandelt werden [4.8].



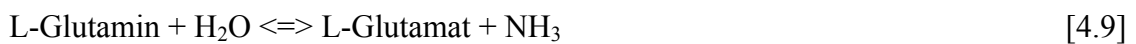
Im Zusammenhang mit der Asparaginase sind vier Gene (BLi02433, BLi02777, BLi02778 und BLi04140) in DSM13 annotiert. Bei der Kultivierung von DSM13 mit L-Asparagin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle zeigt nur das Gen BLi04140 eine erhöhte Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose (Tab. 4.14). Von den zwei Genen (BLi00528 und BLi04139), welche im Zusammenhang mit der Aspartase in DSM13 annotiert sind, konnte nur für den ORF BLi04139 eine erhöhte Expression beim Wachstum mit L-Aspartat ermittelt werden. Ergänzend kann noch hinzugefügt werden, dass für beide eben angesprochenen ORFs, BLi04139 (*AnsB*) und BLi04140 (*AnsA*), sowohl beim Wachstum mit L-Asparagin, als auch mit L-Aspartat eine Erhöhung des Expressionsverhältnisses ermittelt werden konnte. Im Genom von *B. licheniformis* DSM13 sind diese Gene in einem Operon mit dem Gen des zugehörigen transkriptionalen Repressors, *ansR*, lokalisiert (Abb. 4.16). In direkter Nachbarschaft hiervon sind ORFs lokalisiert, welche im Zusammenhang mit der Verwertung von Malat stehen. Hierbei kodiert das Gen *mleN* für einen Malat-H⁺/Na⁺-Lactat Antiporter und *mleA* für ein mögliches Malo-Lactat-Enzym. Begrenzt werden sie von dem Gen *ykgB*, welches für ein Protein kodiert, dessen Funktion unbekannt ist und dem ORF BLi04136, welcher wiederum für ein hypothetisches Protein kodiert.



Abbildung 4.16: Genregion des *ansAB* Operon. Erläuterungen im Text.

L-Glutamin und L-Glutamat

Die Umwandlung von L-Glutamin zu L-Glutamat kann über verschiedene Enzyme erfolgen. Das Enzym Glutaminase (EC 3.5.1.2) katalysiert eine Hydrolase-Reaktion, in welcher L-Glutamin zu L-Glutamat und Ammoniak umgesetzt wird [4.9]. Laut der Annotation sind in DSM13 zwei Gene (BLi00274 und BLi01700) vorhanden, dessen Produkt Ähnlichkeit zu einer Glutaminase aufweisen. Beim Wachstum mit L-Glutamin zeigte nur eines der Gene, *ybgJ* (BLi00274), eine erhöhte Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose (Tab. 4.14).



Lokalisiert ist dieser ORF BLi00274 im Genom von DSM13 in direkter Nachbarschaft zu Genen, welche im Zusammenhang mit einem möglichen Zwei-Komponenten-System stehen (Abb. 4.17). Das Gen *ycbA* kodiert hierbei für ein Enzym, welches Ähnlichkeit zu einer Histidin-Kinase aufweist und das Produkt des Gens *ycbB* Ähnlichkeit zu einem dazugehörigen Response-Regulator. Interessanterweise ist *downstream* des ORFs BLi00274 ein Bereich von etwa 1,6 kb vorhanden, in dem kein Gen annotiert wurde.



Abbildung 4.17: Genregion des die Glutaminase kodierenden Gens des Göttinger Genomlabors. Erläuterungen im Text.

Neben dem Göttinger Genomlabor wurde *B. licheniformis* DSM13 parallel von der Firma Novozymes Biotech Inc sequenziert (Rey et al., 2004). Im Gegensatz zu Ersteren verwendete Novozymes für diese Genregion keine so genannten Y-ORFs, sondern wählten Genbezeichnungen, wie sie für *B. subtilis* beschrieben sind (vgl. Satomura et al., 2005). Hierbei kodiert *glnL* für den Response-Regulator, *glnK* für die Histidin-Kinase und *glsA* für die Glutaminase. Des Weiteren wurde für den *downstream* der Glutaminase liegenden Bereich das Gen *glnT* annotiert, welches für einen Natrium-Alanin Symporter kodiert (Abb. 4.18). Ein Sequenzvergleich von *glnT* mit diesem

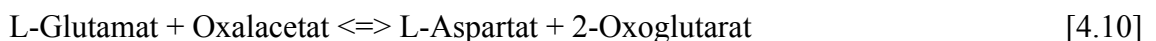
Abschnitt der Genregion des Göttinger Genomlabors mittels BLAST ergab eine 100%ige Übereinstimmung auf Nukleotidebene (Abb. 7.1 im Anhang).



Abbildung 4.18: Genregion des die Glutaminase kodierenden Gens der Firma Novozymes. Erläuterungen im Text.

Ein weiteres Enzym mit welchem die Verwertung von L-Glutamin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle eingeleitet werden kann ist die Glutamat-Synthase (EC 1.4.1.13). Durch die Arbeiten von Schreier und Bernlohr (1984) konnte für *B. licheniformis* gezeigt werden, dass diese aus zwei Untereinheiten besteht. Annotiert wurden die zugehörigen Gene als *gltA* (BLi02162) und *gltB* (BLi02161). Beim Wachstum mit L-Glutamin waren diese Gene, im Vergleich zum Wachstum mit Glucose, reprimiert (Tab. 4.14).

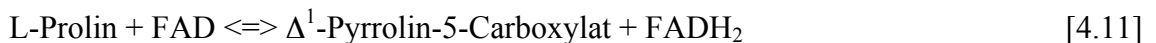
Die Verwertung von L-Glutamat in Enterobakterien kann über drei Wege erfolgen (McFall & Newman, 1996). Neben der Möglichkeit die Glutamat-Dehydrogenase oder die Glutamat-Decarboxylase zum Abbau von L-Glutamat zu verwenden, konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass die Transaminierung der bevorzugte Weg ist (Marcus & Halpern, 1969). Hierbei werden zunächst L-Glutamat und Oxalacetat durch die Aspartat-Aminotransferase (EC 2.6.1.1) zu L-Aspartat und 2-Oxoglutarat umgesetzt [4.10]. L-Aspartat kann im Weiteren durch die Aspartase zu Fumarat umgewandelt werden [4.8].



Im Vergleich zum Wachstum mit Glucose konnte für das die Aspartat-Aminotransferase kodierende Gen *aspB* (BLi02372) keine erhöhte Expression beim Wachstum mit L-Glutamat beobachtet werden (Tab. 4.14). Auch für die drei ORFs dessen Produkt Ähnlichkeit zu Aspartat-Aminotransferasen aufweisen, BLi01514, BLi03434 und BLi04237, konnte ebenfalls keine erhöhte Expression beim Wachstum mit L-Glutamat ermittelt werden.

L-Prolin

An dem Abbau von L-Prolin zu L-Glutamat sind zwei Enzyme beteiligt. Zunächst wird L-Prolin, katalysiert durch die Prolin Oxidase (EC 1.5.99.8, BLi00373), zu Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat umgesetzt [4.11]. Letzteres wird im Anschluss daran zu L-Glutamat umgewandelt [4.4]. Diese Reaktion wird durch das Enzym Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (EC 1.5.1.12, BLi00374) katalysiert.



Sowohl BLi00373 (*ycgM*), als auch BLi00374 (*ycgN*) zeigten beim Wachstum mit L-Prolin als alleinige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle eine erhöhte Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose (Tab. 4.14). Hinzuzufügen ist in diesem Kontext, dass beide Gene in direkter Nachbarschaft im Genom von DSM13 liegen (Abb. 4.19). Des Weiteren ist dort auch das Gen *ycgO* lokalisiert, dessen Produkt Ähnlichkeit zu einer Prolin-Permease aufweist. Auch dieses Gen zeigte beim Wachstum mit L-Prolin eine erhöhte Expression (Tab. 7.4 im Anhang).



Abbildung 4.19: Genregion der am Abbau von L-Prolin beteiligten ORFs. Erläuterung im Text.

L-Ornithin

Die nicht-proteinogene Aminosäure L-Ornithin ist ein Zwischenprodukt des Abbaus von L-Arginin zu L-Glutamat über den Arginase degradativen Weg. Wie bereits zuvor erläutert wird L-Ornithin durch die Ornithin-Aminotransferase (EC 2.6.1.13, BLi00422) zu L-Glutamat und L-Glutamat-Semialdehyd umgesetzt. Letzteres wird zunächst spontan zu Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat und anschließend durch das Enzym Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (EC 1.5.1.12, BLi00374) zu L-Glutamat umgewandelt.

Wie schon bei der Verwertung von L-Arginin zu beobachten war, so zeigten auch mit L-Ornithin gewachsene Zellen von DSM13 eine erhöhte Expression dieser beiden Gene im Vergleich zum Wachstum mit Glucose (Tab. 4.14).

4.3.1.2.2. Gene mit gleicher Genexpression

Bei den Untersuchungen zum Einmünden der Aminosäuren in den Zentralmetabolismus konnte beobachtet werden, dass Zellen, welche auf unterschiedlichen Aminosäuren gewachsen waren, die gleiche Expression bestimmter Gene zeigten. Um zu untersuchen, ob es Gene gibt, die bei allen auf proteinogenen Aminosäuren gewachsenen Zellen eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose zeigten, wurde zunächst die Anzahl der Gene festgestellt, welche eine signifikante Änderung der Expression zeigten (Tab. 4.15). Wie bereits im Vorfeld erläutert, wurde als signifikant eine mindestens dreifache Änderung des *ratio of medians* erachtet, dieser entspricht logarithmiert zur Basis 2 1,5849 bzw. $-1,5849$.

Tabelle 4.15: Anzahl von Genen, welche eine signifikante Änderung der Expression beim Wachstum mit den einzelnen Aminosäuren zeigten.

Aminosäure	Gesamtzahl der ORFs	
	> 1,5849	< -1,5849
L-Alanin	112	35
L-Arginin	382	164
L-Asparagin	151	60
L-Aspartat	86	46
L-Glutamin	365	105
L-Glutamat	245	67
L-Prolin	140	120

Mittels eines Informatikprogramms (A. Wollherr, unveröffentlicht), welches in der Programmiersprache Perl geschrieben wurde, konnten nach vergleichender Darstellung Gene identifiziert werden, welche reproduzierbar bei allen auf Aminosäuren gewachsenen Zellen eine signifikante Erhöhung der Expression zeigten. Um den Effekt

auszuschließen, dass eine Katabolitrepression auf Glucose gewachsenen Zellen als erhöhte Expression bei Aminosäure gewachsenen Zellen interpretiert wird, wurden zusätzlich Daten von Transkriptionsanalysen Gluconat gewachsener Zellen vergleichend mit einbezogen. Diese zeigten keine signifikante Änderung des Expressionsverhältnisses (Tab. 7.6 im Anhang).

Tabelle 4.16: Gene mit gleicher Genexpression. Dargestellt ist die Schnittmenge an Genen, welche beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren eine signifikante Erhöhung der Expression zeigten.

ID	Gen	Annotation
BLi00853	<i>acoR</i>	transkriptionaler Aktivator des Acetoin-Dehydrogenase Operon
BLi01143	<i>melA</i>	α -D-Galaktosid-Galaktohydrolase
BLi02102		putative Enoyl(3-hydroxyisobutyryl)-Coenzyme A Hydratase-Protein
BLi02103		putative Enoyl-CoA-Hydratase
BLi02104	<i>mmsA</i>	Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase
BLi02105		putative 2-Hydroxy-3-Oxopropionat-Reductase
BLi02106		putative Butyryl-CoA-Dehydrogenase
BLi03498		putative Pectin-Methylesterase
BLi04275		homolog zu Ald: L-Alanin-Dehydrogenase

Unter den noch verbleibenden in der Tabelle 4.16 dargestellten ORFs ist das Gen des transkriptionalen Aktivators der *aco*-Gene, *acoR* (BLi0853), zu finden. Ebenso wie der ORF BLi02104, welcher für eine Methylmalonat-Semialdehyd Dehydrogenase kodiert. Gleiches gilt für die im Genom jeweils zwei angrenzenden Gene *upstream* (BLi02105, BLi02106) und *downstream* (BLi02103, BLi02102) (Abb. 4.20). Ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Expression bei Aminosäure gewachsenen Zellen konnte für BLi04275, welches für ein Homolog der L-Alanin-Dehydrogenase kodiert, beobachtet werden.



Abbildung 4.20: Genregion BLi02106 - BLi02102. Erläuterung der Proteinfunktion ist der Tabelle 4.16 zu entnehmen.

4.3.1.2.3. Gene mit unterschiedlicher Genexpression

In einem nächsten Schritt wurde nun untersucht, ob einzelne Gene oder Gruppen von Genen identifiziert werden können, welche charakteristisch für die Verwertung einzelner Aminosäuren sind. Wie schon bei Genen mit gleicher Genexpression wurden zunächst die Gene vergleichend dargestellt. Als signifikant wurde auch hier eine Änderung des *ratio of medians* um mindestens einen Faktor 3 erachtet. Anschließend konnten mit einem weiteren in Perl geschriebenen Informatikprogramm (H. Kurka, unveröffentlicht) Gene identifiziert werden, welche reproduzierbar charakteristisch für das Wachstum mit einer Aminosäure sind (Tab. 4.17). In diesem Kontext konnten 45 Gene ermittelt werden, welche reproduzierbar eine signifikante Erhöhung des Expressionsverhältnisses zeigten, wenn die Zellen mit L-Asparagin gewachsen waren. Darunter befinden sich die die Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase kodierenden Gene *pdhABCD*.

Tabelle 4.17: Anzahl charakteristischer Gene für das Wachstum auf einzelnen Aminosäuren.

Aminosäure	log Expressionsverhältnis > 1,5849
L-Alanin	6
L-Arginin	86
L-Asparagin	45
L-Aspartat	2
L-Glutamin	80
L-Glutamat	19
L-Prolin	22

Am Beispiel der Pyruvat-Dehydrogenase sollen nun vergleichend die logarithmierten Expressionswerte Aminosäure gewachsener Zellen dargestellt werden. Wie der Abbildung 4.21 zu entnehmen ist, konnte nur eine signifikante Erhöhung der Expression beobachtet werden, wenn Zellen von DSM13 mit L-Asparagin als alleiniger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle angezogen wurden. Für die verbleibenden sechs Aminosäuren konnte für einige Untereinheiten eine entgegengesetzte Expression

ermittelt werden. Beispielhaft können hierfür die kodierenden Gene der Untereinheiten PdhA und PdhB beim Wachstum mit L-Prolin angeführt werden.

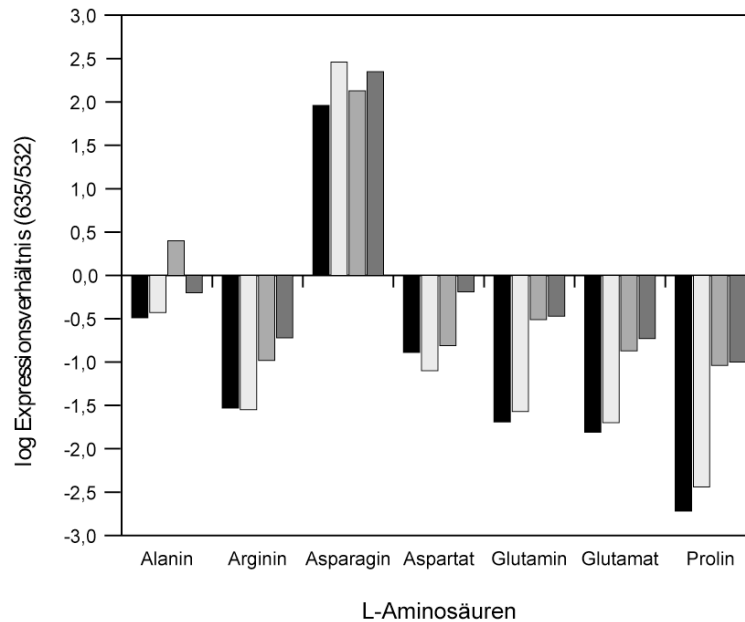


Abbildung 4.21: Vergleichende Darstellung von Expressionverhältnissen. Übersicht der die Pyruvat-Dehydrogenase kodierenden Gene *pdhA* (■), *pdhB* (□), *pdhC* (▒) und *pdhD* (▓) beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

4.3.1.2.4. Genexpressionsdaten weiterer Enzyme

Wie bereits im Abschnitt 4.3.1.2.1. beschrieben, zeigten eine Anzahl von Genen eine ähnlich erhöhte Expression bei der Kultivierung auf verschiedenen Aminosäuren. Diese Aminosäuren wiederum können aufgrund ihres Einmündens in den Zentralmetabolismus in Gruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 stellt L-Alanin dar, welches über Pyruvat in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust wird. Die zweite Gruppe besteht aus L-Asparagin und L-Aspartat. Aminosäuren, welche über L-Glutamat in den Zentralmetabolismus einmünden, können in einer dritten Gruppe zusammengefasst werden. Betrachtet man nur die proteinogenen Aminosäuren, sind dieses L-Glutamin, L-Glutamat, L-Arginin und L-Prolin. Letztere beiden nehmen aufgrund ihres gemeinsamen Zwischenproduktes, Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat, eine Sonderstellung ein. In den folgenden Ausführungen soll nun näher auf Genexpressionsdaten weiterer Enzyme der zweiten Gruppe eingegangen werden.

Um gemeinsame Genexpressionsdaten der Gruppe II, L-Asparagin und L-Aspartat, zu erhalten, wurden, wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits beschrieben, Gene mit signifikant erhöhter Expression vergleichend dargestellt. Im Anschluss daran wurde daraus die Ausschlußmenge bestimmt. In dieser Ausschlußmenge (Tab. 7.5 im Anhang) sind neben dem *ansAB* Operon, dem Gen des zugehörigen Repressor, *ansR*, auch Gene enthalten, welche im Zusammenhang mit der möglichen Verwertung von Malat stehen (Tab. 4.18). Hierbei handelt es sich um die bereits im Zusammenhang mit dem Einmünden der Aminosäuren in den Zentralmetabolismus erläuterten Gene *mleA* und *mleN*.

Tabelle 4.18: Auswahl an Genen, welche aufgrund ihrer Expressionsdaten im Zusammenhang mit L-Asparagin und L-Aspartat stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit der angegebenen Aminosäure im Vergleich zur Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			Asn / Glc	Asp / Glc
BLi04137	<i>mleA</i>	mögl. Malo-Lactat-Enzym	4,72	3,94
BLi04138	<i>mleN</i>	Malat-H ⁺ /Na ⁺ -Lactat Antiporter	4,32	3,47
BLi04139		homolog zur AnsB L-Aspartase	4,67	3,65
BLi04140	<i>ansA</i>	L-Asparaginase	5,55	4,67
BLi04141	<i>ansR</i>	transkriptionaler Repressor des <i>ansAB</i> Operons	3,00	3,23

Ein weiteres Beispiel für Genexpressionsdaten weiterer Enzyme mit L-Asparagin bzw. L-Aspartat als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle stellen die Citratsynthasen dar. *B. licheniformis* DSM13 besitzt drei Citratsynthasen: CitA (Citratsynthase I, BLi01010), CitZ (Citratsynthase II, BLi03062) und MmgD (Citratsynthase III, BLi04094). Eine vergleichende Darstellung der logarithmierten Expressionverhältnisse der ORFs der Citratsynthasen zeigte, dass beim Wachstum mit L-Asparagin bzw. L-Aspartat nur bei dem die Citratsynthase I kodierenden Gen *citA* eine signifikant erhöhte Expression beobachtet werden konnte. Beim Wachstum mit den anderen proteinogenen Aminosäuren, welche als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können, zeigte hingegen das Gen *mmgD*, welches für die Citratsynthase III kodiert, eine

signifikant erhöhte Expression (Abb. 4.22). Hierbei ist anzumerken, dass das für die Citratsynthase III kodierende Gen im Genom an *mmgE* und *yqiQ* angrenzt. Gene, welche im Zusammenhang mit dem Methylcitratzyklus stehen. Hierauf wird unter 4.6 in dieser Arbeit eingegangen.

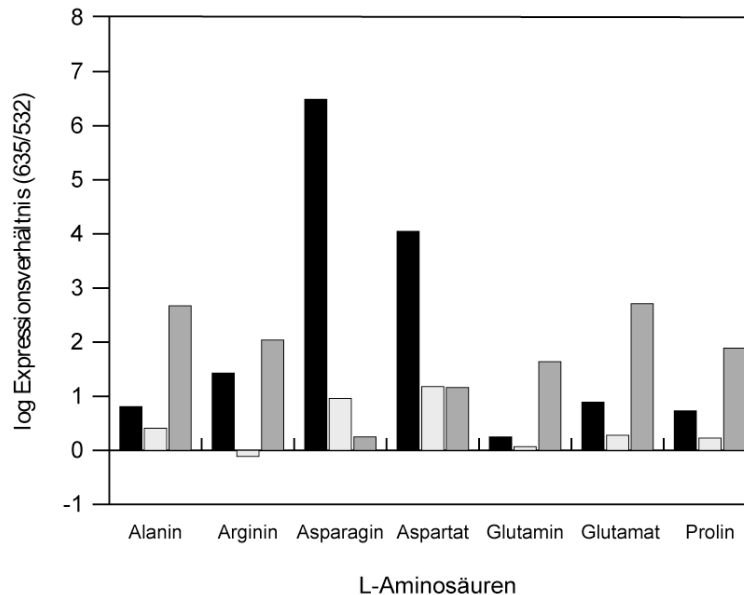


Abbildung 4.22: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen. Übersicht der die drei Citratsynthasen kodierenden Gene *citA* (■), *citZ* (□) und *mmgD* (■) beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

4.3.1.3. Verifizierung ausgewählter Daten aus DNA-Microarray-Experimenten durch *real-time* RT-PCR

In den vorangegangenen Abschnitten wurden ausgewählte Gene dargestellt, welche zum einen bei allen auf Aminosäuren gewachsenen Zellen (4.3.1.2.2.) eine signifikante Erhöhung der Expression zeigten oder zum anderen aufgrund ihres Expressionsverhältnisses als charakteristisch für das Wachstum auf einzelnen Aminosäuren eingestuft werden konnten (4.3.1.2.3.). Diese aus DNA-Microarray-Analysen gewonnenen Expressionsdaten sollten für eine Auswahl an Genen über eine zweite unabhängige Methode verifiziert werden. Für die Analyse mittels *real-time* RT-PCR wurde, wie für die DNA-Microarray-Analysen, RNA aus *B. licheniformis* Zellen gewonnen, welche in je zwei unabhängigen Experimenten auf einzelnen Aminosäuren bzw. im Chemostaten kultiviert wurden.

Tabelle 4.19: Vergleichende Darstellung der mittels DNA-Microarray bzw. *real-time* RT-PCR ermittelten Expressionsdaten. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit der angegebenen Aminosäure, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse													
			Ala / Glc	Arg / Glc	Asn / Glc	Asp / Glc	Gln / Glc	Glu / Glc	Pro / Glc	Ala / Glc	Arg / Glc	Asn / Glc	Asp / Glc	Gln / Glc	Glu / Glc	Pro / Glc
BLi00853	<i>acoR</i>	transkriptionaler Aktivator des Acetoin- Dehydrogenase Operons	2,32	2,76	1,85	3,13	2,63	2,90	2,88							
BLi02104	<i>mmsA</i>	Methylmalonat-Semialdehyd- Dehydrogenase	4,02	4,09	3,92	3,65	3,22	5,04	3,52							
BLi04275		homolog zu Ald: L-Alanin-Dehydrogenase	7,41	6,28	8,37	2,72	3,42	2,11	3,57							
BLi01677	<i>pdhD</i>	Pyruvat-Dehydrogenase / 2-Oxoglutarat- Dehydrogenase (Untereinheit)	-0,20	-0,72	2,35	-0,19	-0,47	-0,73	-1,00							
BLi00853	<i>acoR</i>	transkriptionaler Aktivator des Acetoin- Dehydrogenase Operons	1,7	2,2	0,8	1,5	1,9	2,5	1,5							
BLi02104	<i>mmsA</i>	Methylmalonat-Semialdehyd- Dehydrogenase	3,1	5,2	3,2	3,9	3,4	4,3	4,6							
BLi04275		homolog zu Ald: L-Alanin-Dehydrogenase	6,3	4,3	7,6	1,4	3,5	1,9	4							
BLi01677	<i>pdhD</i>	Pyruvat-Dehydrogenase / 2-Oxoglutarat- Dehydrogenase (Untereinheit)	0,1	0,2	2,4	-0,6	-1,6	0	0,6							

DNA-Microarray

real-time RT-PCR

Es wurden für jede RNA zwei konstitutive Gene mitgeführt, wobei für die Normalisierung eines der Gene benutzt wurde (Daten nicht angegeben). Die Berechnung der Expressionswerte erfolgte nach der Ermittlung der Ct-Werte, wie unter 3.7.6. beschrieben.

In der Tabelle 4.19 sind vergleichend die Resultate der mittels DNA-Microarray bzw. *real-time* RT-PCR durchgeführten Genexpressionsanalysen für verschiedene ORFs dargestellt. Mit einer Ausnahme konnte für alle betrachteten Aminosäuren die erhöhte Expression für das Gen des transkriptionalen Aktivators des Acetoin-Dehydrogenase Operons, *acoR*, bestätigt werden. Lediglich für das Wachstum mit L-Asparagin konnte reproduzierbar keine erhöhte Expression ermittelt werden. Des Weiteren konnte nicht nur für den eine Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodierenden ORF BLi02104, sondern auch für den ORF BLi04275, welcher wiederum für ein Homolog der L-Alanin-Dehydrogenase kodiert, die erhöhte Expression beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren bestätigt werden. Die Daten für das Gen einer Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase (BLi01677) konnten ebenfalls via *real-time* RT-PCR verifiziert werden. Nur Zellen, welche mit L-Asparagin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle angezogen wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Expression.

4.3.2. Wachstum mit Gemischen von Aminosäuren

Vorangegangene Experimente zeigten, welche der untersuchten Aminosäuren einzeln als Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle dienen können. In der Natur liegen Aminosäuren aber nicht einzeln, sondern in der Regel als Gemische vor. In der Abbildung 4.23 ist der prozentuale Anteil einzelner Aminosäuren am Gesamtprotein vergleichend dargestellt. Für weitere Untersuchungen wurde die Aminosäurezusammensetzung der Sojabohne ausgewählt. Hierzu wurde einem definierten Medium, welches keine Stickstoff- oder Kohlenstoffquellen enthielt, die Menge an Aminosäuren zugegeben, die 20 g Sojabohne pro Liter Medium entsprechen (vgl. 3.2.2.). Da aufgrund des Versuchaufbaus zur Ermittlung des Aminosäuregehaltes nach FAO keine Angaben zum Gehalt an Asparagin und Glutamin ermittelt werden konnten, wurde der Gehalt an Aspartat bzw. Glutamat halbiert, so dass ein Mix aus 20 proteinogenen Aminosäuren hergestellt werden konnte.

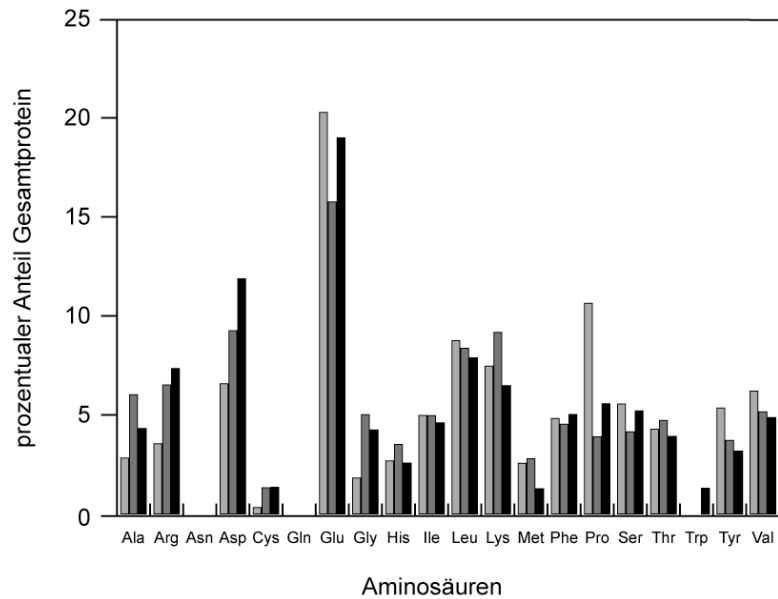


Abbildung 4.23: Zusammensetzung des Aminosäuregehalts von Nahrungsmitteln. Nach FAO (Food And Agriculture Organization Of The United Nations), Stand 1981. Kuh-Casein (■), Rind- und Kalbsfleisch (■), Sojabohne (■).

4.3.2.1. Verwertung eines Gemisches aus sieben Aminosäuren

Wie bereits gezeigt wurde, kann DSM13 sieben proteinogene Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nutzen (vgl. 4.3.1.1., Tab. 4.13). Um das Wachstum von *B. licheniformis* auf Gemischen von Aminosäuren zu untersuchen, wurde zunächst ein Gemisch aus diesen sieben Aminosäuren zusammengestellt, welches der Sojabohne nachempfunden war (vgl. 3.2.2.). Während des Wachstums von DSM13 in einem definierten Medium mit dem Gemisch dieser sieben Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, um mittels Ionenchromatographie den Verbrauch der Aminosäuren im Kulturüberstand zu detektieren (Abb. 4.24A). Diese Untersuchungen zeigten, dass zu Beginn des Wachstums alle Aminosäuren genutzt werden, sich aber die Rate des Verbrauchs unterscheidet. Die erste Aminosäure, die nicht mehr im Kulturüberstand detektiert werden konnte, war L-Asparagin. Erst im Anschluss daran wurde ein signifikanter Verbrauch der verbleibenden Aminosäuren beobachtet. Noch vor dem Einschwenken in die stationäre Phase waren nur noch L-Aspartat und L-Glutamat als proteinogene Aminosäuren im Kulturüberstand zu detektieren.

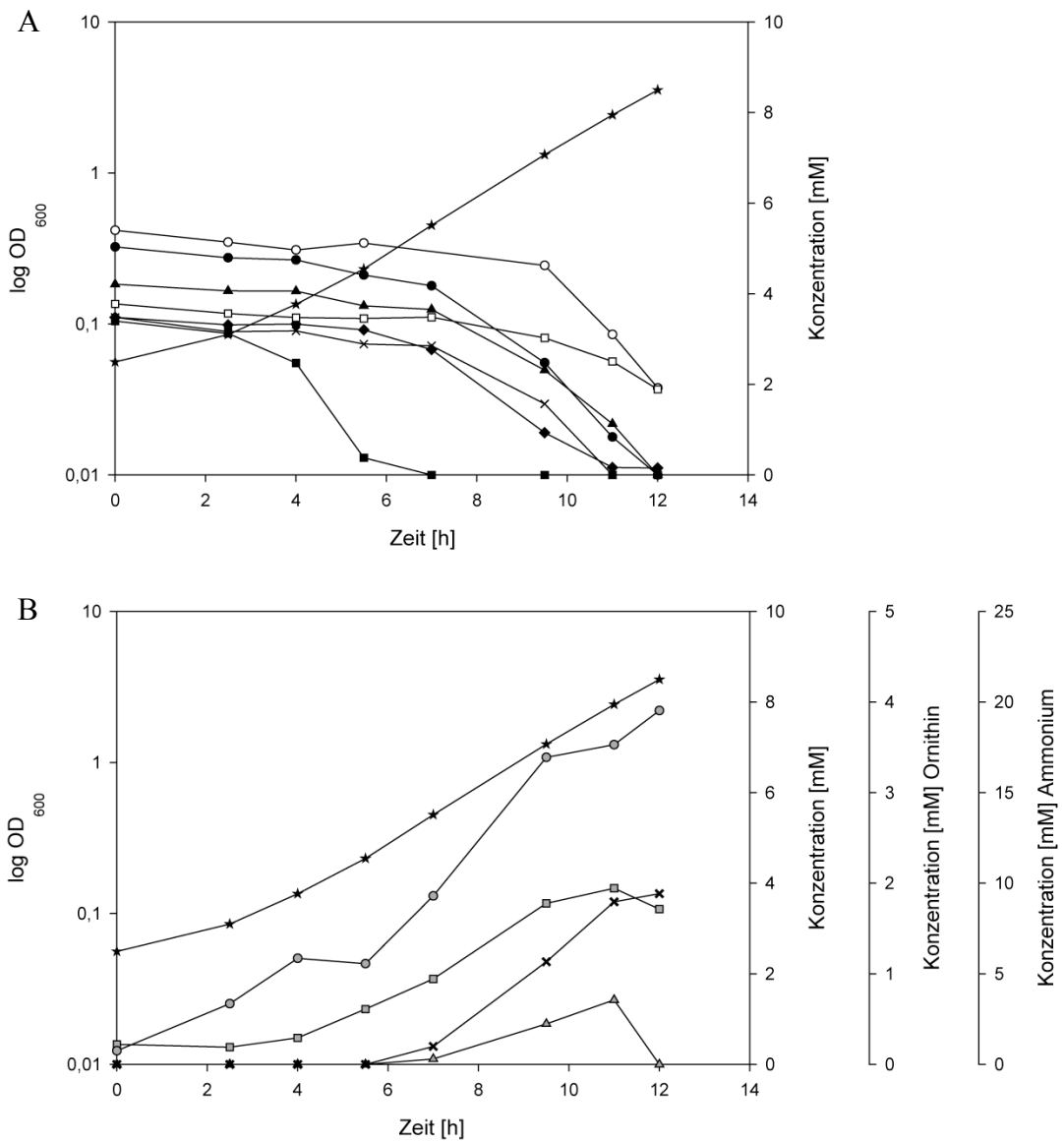


Abbildung 4.24: Wachstumsverlauf von DSM13 auf einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren. Neben der jeweiligen Darstellung des Wachstums von DSM13 (★) ist in **A** der Verbrauch der Aminosäuren L-Alanin (◆), L-Arginin (×), L-Asparagin (■), L-Aspartat (□), L-Glutamin (●), L-Glutamat (○) und L-Prolin (▲) abgebildet. **B** zeigt die einhergehende Akkumulation von Acetat (□), Ammonium (●) und Harnstoff (×). Außerdem konnte die Bildung und der Verbrauch von L-Ornithin (▲) beobachtet werden. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Neben dem Verbrauch der proteinogenen Aminosäuren wurden noch weitere Substanzen im Kulturüberstand detektiert (Abb. 4.24B). Während des Wachstums von DSM13 konnte eine Anhäufung von Acetat mittels Ionenchromatographie ermittelt werden (3.9.2.2). Um zu überprüfen, ob es sich nicht um Acetoin handelt, welches die

gleiche Retentionszeit wie Acetat bei den in dieser Arbeit verwendeten analytischen Säulen hatte, wurde zunächst eine Bestimmung von Acetoin durchgeführt (3.9.5.). Es konnte jedoch kein Acetoin im Kulturüberstand detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Durch UV-Tests zur Bestimmung von Acetat konnten die zuvor ermittelten Daten der Ionenchromatographie verifiziert werden (3.9.4.). Während des Wachstums von DSM13 in dem definierten Medium mit sieben Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle konnte außerdem die Anhäufung von Ammonium im Kulturüberstand mittels Ionenchromatographie detektiert werden. Diese Daten konnten anschließend durch UV-Tests verifiziert werden (3.9.6.).

Ein einleitender Schritt zum Abbau von L-Arginin wird durch die Arginase katalysiert, wobei L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin umgesetzt wird. Im Rahmen der Analyse der Kulturüberstände konnte eine Akkumulation von Harnstoff detektiert werden. Im Genom von *B. licheniformis* DSM13 wurden keine Gene annotiert, die im Zusammenhang mit der Verwertung von Harnstoff stehen. Zur experimentellen Überprüfung wurde DSM13 in einem definierten Medium mit 30 mM Harnstoff als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle kultiviert. Zusätzlich wurde noch überprüft, ob DSM13 Harnstoff als Stickstoffquelle nutzen kann. Hierzu wurde er in einem definierten Medium mit 50 mM Glucose, als reprimierenden Zucker, bzw. 50 mM Xylose, als nicht-reprimierenden Zucker, und 10 mM Harnstoff als Stickstoffquelle kultiviert. Wie schon zu erwarten, zeigten diese Wachstumsexperimente, dass DSM13 Harnstoff weder als Stickstoff-, noch als Kohlenstoffquelle nutzen kann (Daten nicht gezeigt). Etwas zeitversetzt mit der beginnenden Akkumulation von Harnstoff war eine Anhäufung von L-Ornithin im Kulturüberstand zu beobachten. Dieses wurde jedoch wieder verbraucht, nachdem kein L-Arginin mehr im Kulturüberstand zu detektieren war (Abb. 4.24B).

4.3.2.2. Transkriptionsanalysen zur Verwertung eines Gemisches aus sieben Aminosäuren

Wie schon beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren wurden auch zur Verwertung eines Gemisches aus sieben Aminosäuren Transkriptionsanalysen durchgeführt. Von besonderem Interesse war hierbei, ob Gene, welche sich als charakteristisch für das Wachstum auf einzelnen Aminosäuren erwiesen, auch beim

Wachstum mit einem Gemisch dieser Aminosäuren zu identifizieren waren. Aus diesem Grund wurden für die Transkriptionsanalysen zwei verschiedene Zeitpunkte so gewählt, dass beim ersten Zeitpunkt L-Asparagin noch im Kulturüberstand zu detektieren war, zum zweiten Zeitpunkt nicht mehr (Abb. 4.25).

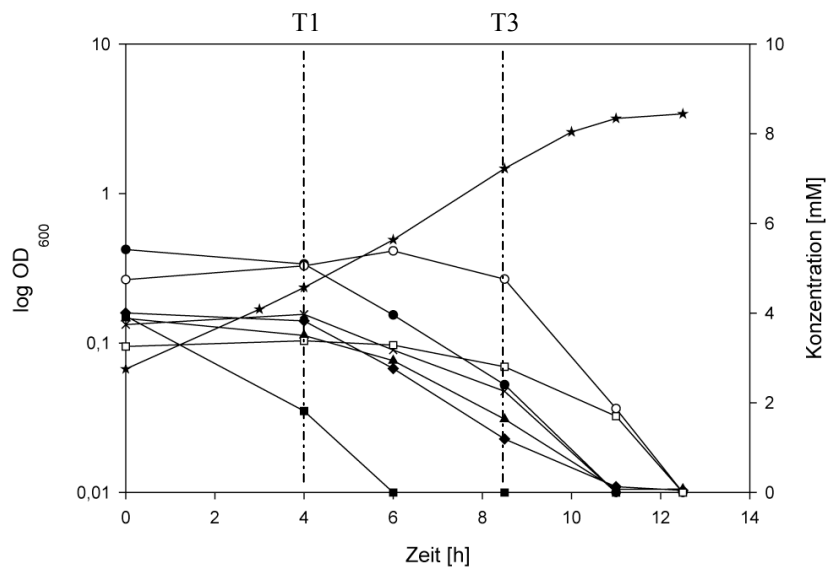


Abbildung 4.25: Zeitpunkte der durchgeführten Transkriptionsanalysen. Dargestellt ist das Wachstum von DSM13 (★) mit den Zeitpunkten, zu welchen Kulturanteile zur RNA-Präparation geerntet wurden. Des Weiteren ist der Verbrauch der Aminosäuren L-Alanin (◆), L-Arginin (×), L-Asparagin (■), L-Aspartat (□), L-Glutamin (●), L-Glutamat (○) und L-Prolin (▲) dargestellt. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Anhand von Transkriptionsanalysen konnte im Abschnitt 4.3.1.2.3. gezeigt werden, dass die Gene der Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase lediglich beim Wachstum mit L-Asparagin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle induziert waren. Auch bei der Kultivierung in einem Gemisch aus sieben Aminosäuren konnte eine solche erhöhte Expression mit der Verwertung von L-Asparagin in Zusammenhang gebracht werden. Die Gene der Untereinheiten der Pyruvat Dehydrogenase zeigten zum Zeitpunkt T1 (L-Asparagin ist im Kulturüberstand nachzuweisen, Abb. 4.25), eine signifikant erhöhte Expression. Zum Zeitpunkt T3 (es ist kein L-Asparagin im Kulturüberstand zu detektieren) kann dieses nicht mehr beobachtet werden. (Tab. 4.20).

Tabelle 4.20: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen. Angegeben sind die Expressionsdaten für die Gene der Pyruvat-Dehydrogenase zu den Zeitpunkten der durchgeführten Transkriptionsanalysen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von Aminosäuren, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			T1 / Glc	T3 / Glc
BLi01674	<i>pdhA</i>	Pyruvat-Dehydrogenase	2,95	-1,66
BLi01675	<i>pdhB</i>	Pyruvat-Dehydrogenase	2,94	-1,46
BLi01676	<i>pdhC</i>	Pyruvat-Dehydrogenase	2,08	-0,21
BLi01677	<i>pdhD</i>	Pyruvat-Dehydrogenase / 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase	3,11	0,02

Auch für Gene, welche als charakteristisch für das Wachstum mit L-Asparagin bzw. L-Aspartat identifiziert wurden, konnte eine Expressionsänderung beobachtet werden. Sowohl für die Gene des *ansAB* Operons, als auch für die benachbarten Gene *mleA* und *mleN* konnte eine erhöhte Expression ermittelt werden, wenn L-Asparagin im Kulturüberstand zu detektieren war (Zeitpunkt T1). Auf der anderen Seite konnte keine signifikante Änderung der Expression mehr für diese Gene beobachtet werden, wenn kein L-Asparagin, jedoch noch L-Aspartat zu detektieren war (Zeitpunkt T3, Tab. 4.21).

Tabelle 4.21: Auswahl an Genen, welche aufgrund ihrer Expressionsdaten im Zusammenhang mit L-Asparagin und L-Aspartat stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von Aminosäuren, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			T1 / Glc	T3 / Glc
BLi04137	<i>mleA</i>	mögl. Malo-Lactat Enzym	5,29	-0,34
BLi04138	<i>mleN</i>	Malat-H ⁺ /Na ⁺ -Lactat Antiporter	4,38	-1,27
BLi04139		homolog zur AnsB L-Aspartase	4,45	-0,19
BLi04140	<i>ansA</i>	L-Asparaginase	5,58	-0,41
BLi04141	<i>ansR</i>	transkriptionaler Repressor des <i>ansAB</i> Operons	3,21	-1,10

Ein weiteres Beispiel für die Gruppe II (L-Asparagin / L-Aspartat) sind die Citratsynthasen. Wie bei den eben beschriebenen Genen, so konnte auch für die Citratsynthase I eine Änderung der Expression im Zusammenhang mit L-Asparagin ermittelt werden (Abb. 4.26). Zum Zeitpunkt T1 war das Gen der Citratsynthase I im Vergleich zum Wachstum mit Glucose induziert. Keine signifikante Änderung der Expression war hingegen zum Zeitpunkt T3 zu beobachten.

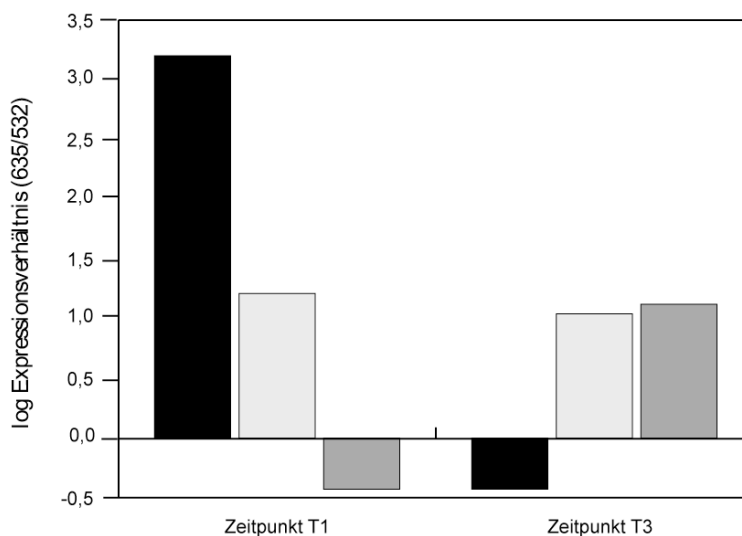


Abbildung 4.26: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen. Übersicht der die drei Citratsynthasen kodierenden Gene *citA* (■), *citZ* (□) und *mmgD* (▒) zu den Zeitpunkten T1 und T3. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Im Rahmen der unter 4.3.1.2.2. vorgestellten Transkriptionsanalysen konnte eine Schnittmenge von ORFs ermittelt werden, die beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren eine signifikante Erhöhung der Expression zeigten. Eben solches konnte auch beim Wachstum mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle beobachtet werden (Tab. 4.22). Neben dem ORF BLi02104, der für eine Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodiert, konnte auch für die im Genom von DSM13 jeweils zwei angrenzenden ORFs *upstream* (BLi02105, BLi02106) und *downstream* (BLi02103, BLi02102) eine Änderung des Expressionsverhältnisses beobachtet werden. Dieses ist unabhängig von der Anwesenheit von L-Asparagin im Kulturüberstand. Zu beiden Zeitpunkten konnte eine signifikant erhöhte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von Aminosäuren ermittelt werden. Dieses konnte ebenfalls für die ORFs BLi03498 und BLi04275 verzeichnet werden.

Tabelle 4.22: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen. Übersicht der unter 4.3.1.2.2. bestimmten Schnittmenge von Genen zu den Zeitpunkten T1 und T3. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von Aminosäuren im Vergleich zur Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. put. - putativ

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			T1 / Glc	T3 / Glc
BLi00853	<i>acoR</i>	transkriptionaler Aktivator des Acetoin-Dehydrogenase Operons	1,91	2,36
BLi01143	<i>mela</i>	α -D-Galaktosid-Galaktohydrolase	1,09	1,81
BLi02102		put. Enoyl(3-hydroxyisobutyryl)-Coenzyme A Hydratase-Protein	2,49	3,49
BLi02103		putative Enoyl-CoA-Hydratase	2,70	3,82
BLi02104	<i>mmsA</i>	Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase	3,00	4,19
BLi02105		putative 2-Hydroxy-3-Oxopropionat-Reductase	3,00	3,64
BLi02106		put. Butyryl-CoA-Dehydrogenase	2,29	3,05
BLi03498		putative Pectin-Methylesterase	2,35	3,98
BLi04275		homolog zu Ald: L-Alanin-Dehydrogenase	7,38	7,19

4.3.2.3. Verwertung eines Gemisches aus 20 Aminosäuren

In einem weiteren Schritt wurde, um das Wachstum auf Gemischen von Aminosäuren zu untersuchen, ein Gemisch aus 20 Aminosäuren zusammengestellt, welches der Sojabohne nachempfunden war (vgl. 3.2.2.). In den folgenden Ausführungen wird zunächst auf die proteinogenen Aminosäuren, welche als alleinige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können, eingegangen (Abb 4.27A). Wie schon bei den Untersuchungen zum Wachstum auf einem Gemisch aus sieben Aminosäuren, konnte auch hier während des Wachstums eine Aufnahme dieser Aminosäuren beobachtet werden, wobei sich aber die Rate des Verbrauchs unterschied. Als erste Aminosäure wurde wieder L-Asparagin komplett verstoffwechselt. Im Anschluss daran konnte ein erhöhter Verbrauch der verbliebenen Aminosäuren beobachtet werden. Zu

Beginn der stationären Phase war nur noch L-Glutamat in erhöhter Konzentration im Kulturüberstand zu detektieren. Auch die in diesem Kontext beschriebene Akkumulation von Harnstoff und L-Ornithin im Kulturüberstand war mit zunehmendem Verbrauch von L-Arginin zu beobachten (Abb. 4.27B). Ebenso wie ein anschließender Verbrauch des L-Ornithins, nachdem L-Arginin nicht mehr detektiert wurde.

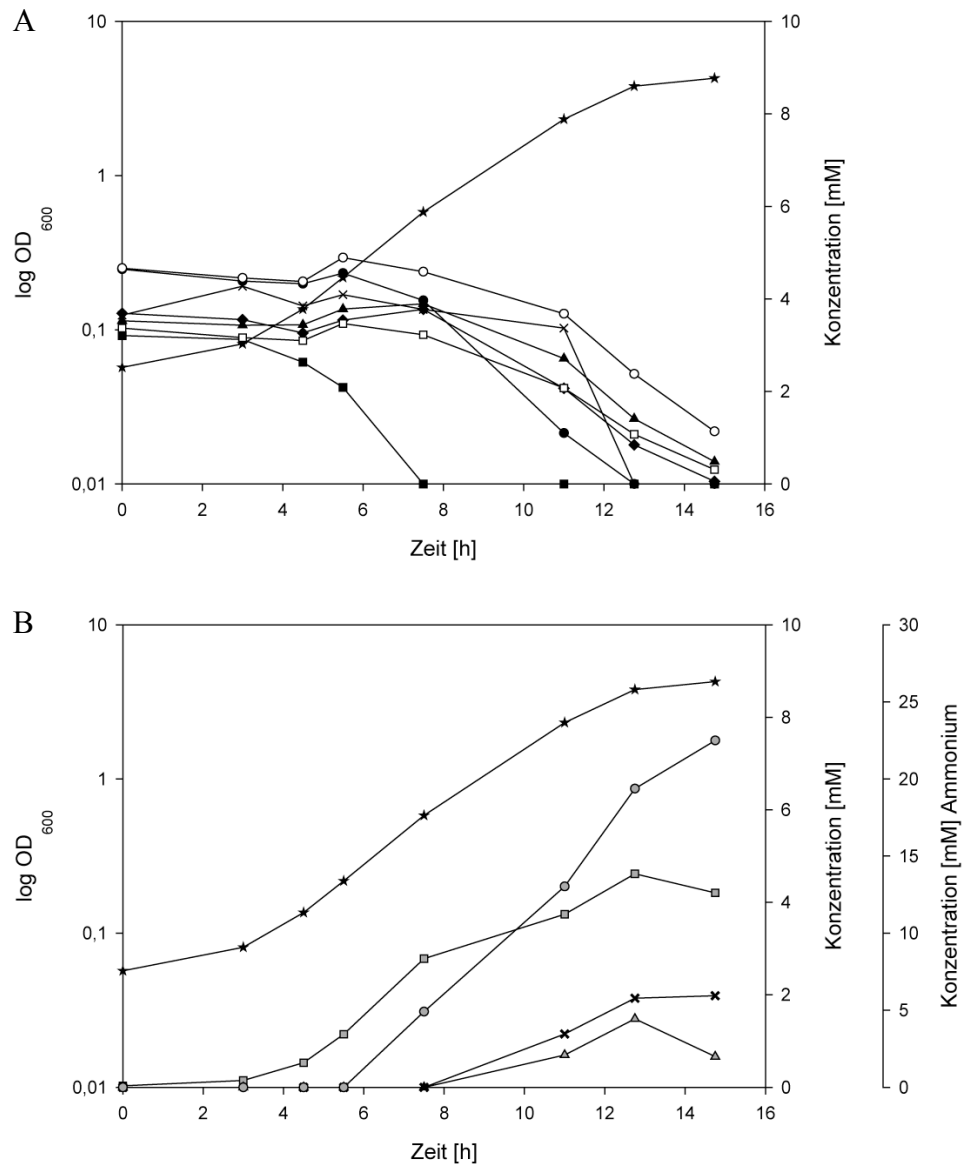


Abbildung 4.27: Wachstumskurve von DSM13 auf einem definierten Medium mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren. Neben der jeweiligen Darstellung des Wachstums von DSM13 (★) ist in A der Verbrauch der Aminosäuren L-Alanin (◆), L-Arginin (×), L-Asparagin (■), L-Aspartat (□), L-Glutamin (●), L-Glutamat (○) und L-Prolin (▲) abgebildet. B zeigt die über die Zeit gesteigerte Akkumulation von Acetat (▣), Ammonium (●) und Harnstoff (×). Des Weiteren konnte die Bildung und der Verbrauch von L-Ornithin (▲) beobachtet werden. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Des Weiteren konnte eine mit dem Wachstum einhergehende Akkumulation von Acetat und Ammonium beobachtet werden. Aus der Abbildung 4.27A ist zu ersehen, dass DSM13 beim Wachstum mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren in die stationäre Phase einschwenkt, wenn die Aminosäuren, welche als alleinige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können, limitierend werden.

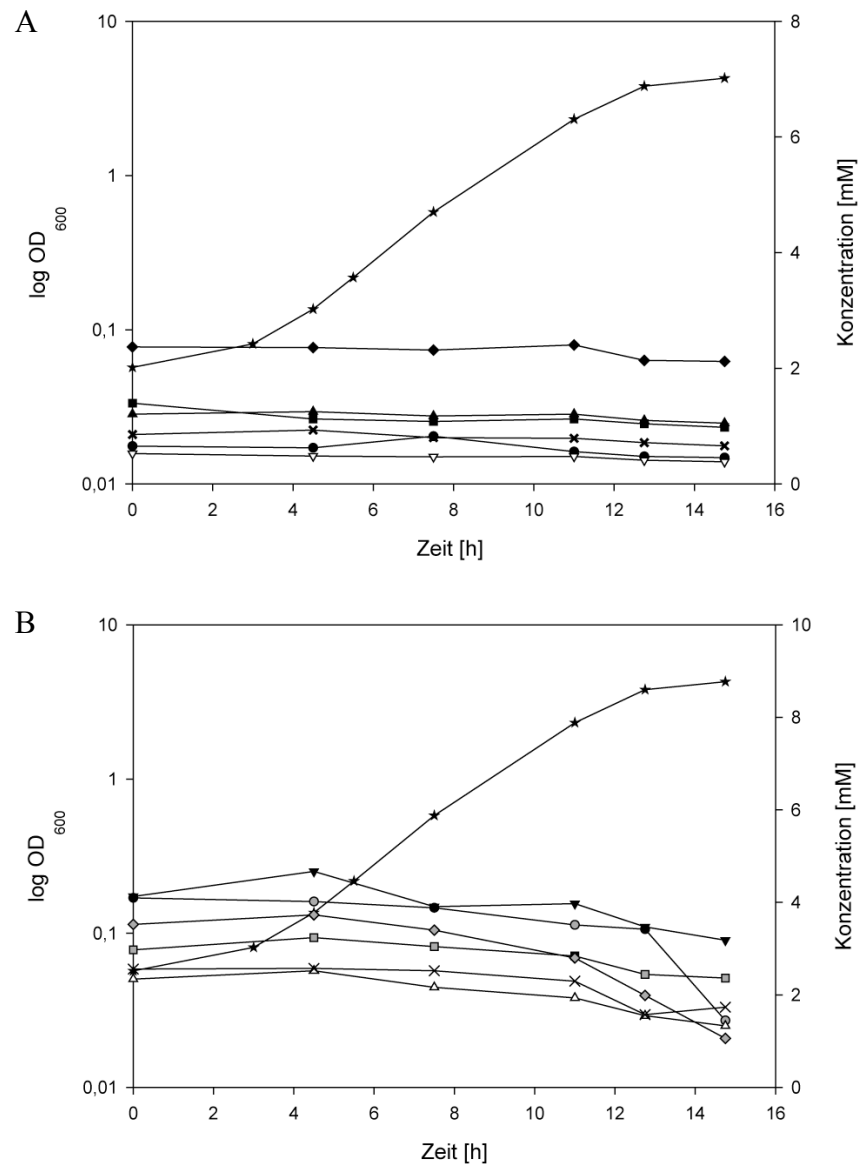


Abbildung 4.28: Wachstumskurve von DSM13 auf einem definierten Medium mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren. Neben der jeweiligen Darstellung des Wachstums von DSM13 (★) sind in **A** die Messungen der Konzentrationen der Aminosäuren L-Phenylalanin (◆), L-Tyrosin (▲), L-Histidin (■), Cystin (✕), L-Methionin (●), L-Tryptophan (▽) angegeben und in **B** der Verbrauch der Aminosäuren L-Serin (◇), L-Threonin (×), L-Valin (▣), Glycin (○), L-Leucin (▼) und L-Isoleucin (△) im Zeitverlauf dargestellt. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Betrachtet man daneben die verbleibenden Aminosäuren im Zeitverlauf, so können Aminosäuren identifiziert werden, für die im Rahmen der durchgeführten Experimente keine Verwertung verzeichnet werden konnte (Abb. 4.28A). Darunter ist neben den aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan auch L-Histidin zu finden. Des Weiteren konnte kein signifikanter Verbrauch von L-Methionin und L-Cystein ermittelt werden. Hier gilt es anzumerken, dass L-Cystein, bedingt durch den Versuchsaufbau, während der Analyse zu der dimeren Form Cystin oxidiert. Auf der anderen Seite wurde mit dem Einschwenken in die stationäre Phase ein gesteigerter Verbrauch für Glycin und L-Serin ermittelt (Abb. 4.28B). Für L-Threonin und die verzweigtkettigen Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin konnte hingegen ein leichter Verbrauch detektiert werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen erfolgte jedoch keine quantitative Analyse von L-Lysin, da es im Zeitverlauf zur Koelution mit anderen Produkten unter den gegebenen Versuchsbedingungen kam. Erste Experimente zur besseren Trennung dieser Substanzen lassen den Schluss zu, dass auch L-Lysin im untersuchten Zeitraum nicht verwertet wird (Daten nicht gezeigt).

4.3.2.4. Transkriptionsanalysen zur Verwertung eines Gemisches aus 20 Aminosäuren

Im Focus des Interesses lag zunächst auch bei diesen Transkriptionanalysen, ob Gene, welche sich als charakteristisch für das Wachstum auf einzelnen Aminosäuren erwiesen, auch beim Wachstum mit einem Gemisch dieser Aminosäuren zu identifizieren waren. Hierzu wurden während des Wachstums von DSM13 mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren zu fünf Zeitpunkten Zellen geerntet, um daraus RNA für Transkriptionsanalysen zu präparieren. Diese Zeitpunkte waren so gewählt, dass zum Zeitpunkt T1 noch L-Asparagin im Kulturüberstand zu detektieren war, sich die Zeitpunkte T2 und T3 während des logarithmischen Wachstums, der Zeitpunkt T4 im Übergang zur stationären Phase und der Zeitpunkt T5 zu Beginn der stationären Phase befand (Abb. 4.29).

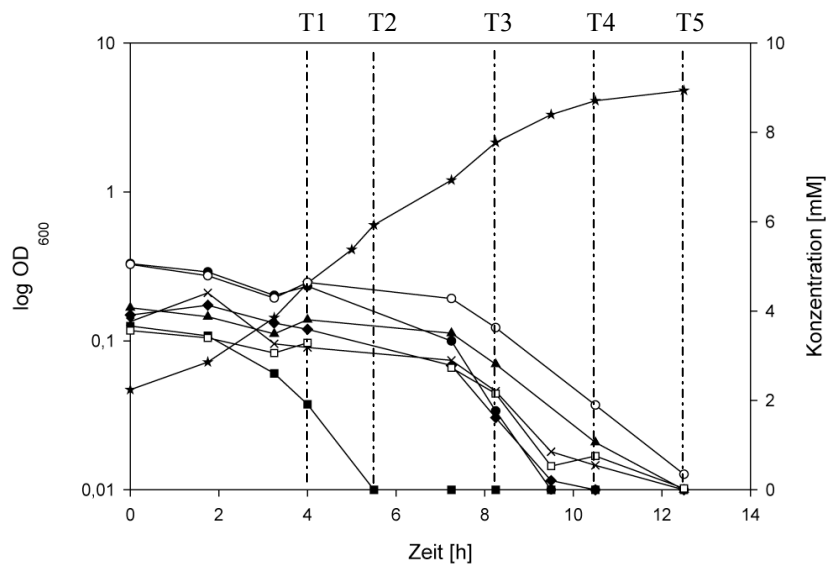


Abbildung 4.29: Zeitpunkte der durchgeführten Transkriptionsanalysen. Dargestellt ist das Wachstum von DSM13 (★) mit den Zeitpunkten, zu welchen Kulturanteile zur RNA-Präparation geerntet wurden. Die Anzucht erfolgte in einem definierten Medium mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren. Des Weiteren ist der Verbrauch der Aminosäuren L-Alanin (◆), L-Arginin (×), L-Asparagin (■), L-Aspartat (□), L-Glutamin (●), L-Glutamat (○) und L-Prolin (▲) dargestellt. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Im Rahmen der Untersuchungen zum Einmünden der Aminosäuren in den Zentralmetabolismus konnten Gene anhand ihrer Expressionsverhältnisse in Verbindung mit dem Abbau von Aminosäuren gebracht werden. Im Weiteren konnten diese anschließend in Gruppen eingeteilt werden (vgl. 4.3.1.2.1. & 4.3.1.2.4.).

Richtet man zunächst sein Augenmerk auf die Gruppe I (Tab. 4.23), so kann man erkennen, dass erst ab dem Zeitpunkt T2 und im Anschluss daran für die weiteren Zeitpunkte, also wenn keine L-Asparagin mehr im Kulturüberstand zu detektieren war, eine erhöhte Expression des Gens der Alanin-Dehydrogenase (*ald*) ermittelt werden konnte. Für den ORF BLi04275 hingegen konnte eine erhöhte Expression bei allen fünf Zeitpunkten im Vergleich zum Wachstum mit Glucose beobachtet werden.

Tabelle 4.23: Vergleichende Darstellung der Expressionsverhältnisse von Genen der Gruppe I.

Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren zu den angegebenen Zeitpunkten, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse				
			T1 / Glc	T2 / Glc	T3 / Glc	T4 / Glc	T5 / Glc
BLi03382	<i>ald</i>	Alanin-Dehydrogenase	-0,60	1,91	2,00	2,56	3,52
BLi04275		homolog zur Ald: Alanin-Dehydrogenase	4,74	6,78	5,97	4,83	4,66

Anders als beim Wachstum mit L-Asparagin als alleiniger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, oder dem Wachstum auf einem Gemisch von sieben Aminosäuren, konnte bei den Transkriptionsanalysen zur Verwertung von 20 Aminosäuren keine reproduziert signifikant erhöhte Expression für die Gene des Multienzymkomplexes der Pyruvat-Dehydrogenase beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.24: Vergleichende Darstellung der Expressionsverhältnisse einer Auswahl an Genen der Gruppe II.

Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren zu den angegebenen Zeitpunkten, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. n.b. - nicht bestimmt

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse				
			T1 / Glc	T2 / Glc	T3 / Glc	T4 / Glc	T5 / Glc
BLi04137	<i>mleA</i>	mögl. Malo-Lactat Enzym	4,40	-0,50	-1,34	-1,21	-1,78
BLi04138	<i>mleN</i>	Malat-H ⁺ /Na ⁺ -Lactat Antiporter	3,78	-1,85	-2,37	n.b.	-3,40
BLi04139		homolog zur AnsB L-Aspartase	3,82	-0,29	-0,47	-0,58	-0,35
BLi04140	<i>ansA</i>	L-Asparaginase	5,15	-0,14	-1,11	-0,68	-0,78
BLi04141	<i>ansR</i>	transkript. Repressor des <i>ansAB</i> Operons	3,81	-0,58	-0,82	0,43	0,05

Für die Gene, welche sich zunächst als charakteristisch für das Wachstum auf L-Asparagin und L-Aspartat (Gruppe II) erwiesen, zeigten auch diese Transkriptionsanalysen eine Änderung der Expression im Zusammenhang mit dem Abbau von L-Asparagin (Tab. 4.24). Zum Zeitpunkt T1, L-Asparagin ist noch im Kulturüberstand zu detektieren, zeigten sowohl die Gene *mleA* und *mleN*, als auch die Gene des *ansAB* Operons bzw. des zugehörigen transkriptionalen Repressors eine signifikante Erhöhung der Expression. Für die weiteren Zeitpunkte T2 bis T5 konnte für diese Gene keine erhöhte Expression, teilweise sogar eine Repression wie am Beispiel des Gens *mleN* zu sehen, ermittelt werden.

Ähnliches konnte auch im Zusammenhang mit den Citratsynthasen beobachtet werden (Abb. 4.30). Solange L-Asparagin im Kulturüberstand zu detektieren war (Zeitpunkt T1), zeigte nur das für die Citratsynthese I kodierende Gen *citA* eine signifikant erhöhte Expression. War zu den Zeitpunkten T2 bis T5 kein L-Asparagin mehr nachzuweisen, konnte eine erhöhte Expression für das Gen der Citratsynthese III, *mmgD*, ermittelt werden.

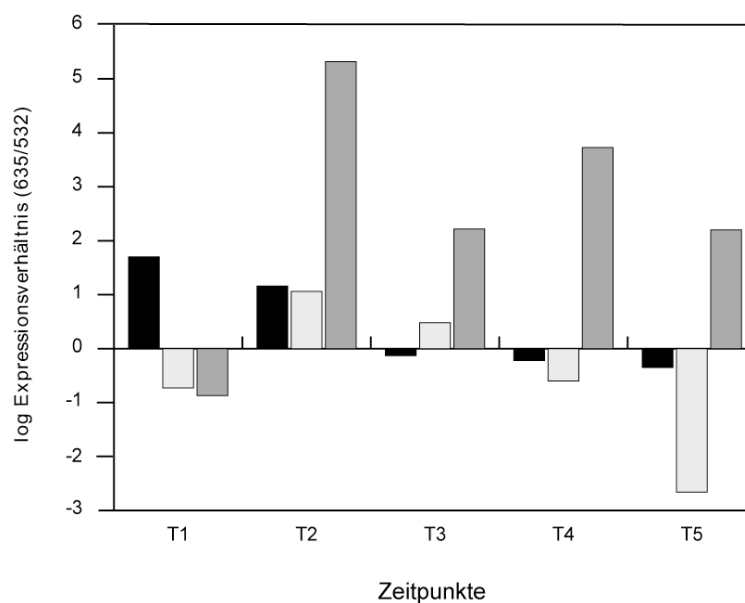


Abbildung 4.30: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen. Übersicht der die drei Citratsynthasen kodierenden Gene *citA* (■), *citZ* (□) und *mmgD* (■) zu den Zeitpunkten T1 bis T5. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Wie bereits unter 4.3.1.2.1. beschrieben zeigte eine Gruppe von Genen sowohl beim Wachstum mit L-Arginin als auch mit L-Prolin eine erhöhte Expression. Dieses konnte auch beim Wachstum mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren bestätigt werden (Tab. 4.25).

Tabelle 4.25: Vergleichende Genexpressionsverhältnisse von Genen, welche im Zusammenhang mit der Verwertung von L-Arginin und L-Prolin stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren zu den angegebenen Zeitpunkten, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle zeigt repräsentative Einzelmessungen. n.b. - nicht bestimmt

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse				
			T1 / Glc	T2 / Glc	T3 / Glc	T4 / Glc	T5 / Glc
BLi00373	<i>ycgM</i>	ähnl. zur Prolin-Oxidase	4,04	5,07	5,59	3,70	2,69
BLi00374	<i>ycgN</i>	ähnl. zur Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-DH	4,75	5,04	6,21	4,76	3,51
BLi00375	<i>ycgO</i>	ähnl. zur Prolin-Permease	1,95	3,76	3,53	1,36	0,54
BLi00421	<i>rocR</i>	transkript. Aktivator des Arginin Operons	-0,45	-1,26	0,06	-0,83	-0,40
BLi00422	<i>rocD</i>	Ornithin-Aminotransferase	1,43	6,23	5,91	5,70	4,26
BLi00423	<i>rocE</i>	Aminosäure-Permease	n.b.	4,25	2,24	1,14	0,10
BLi00424	<i>rocF</i>	Arginase	0,61	4,44	3,96	1,99	1,11
BLi04162		Homolog zum AhrC transkript. Regulator	0,40	1,77	1,29	2,65	2,28
BLi04163		Arginin-Deiminase	6,41	8,18	8,91	8,70	2,51
BLi04164		Ornithin-Carbamoyltransferase	n.b.	8,03	8,17	n.b.	1,79
BLi04165		putative Zucker-Permease	n.b.	4,17	5,55	n.b.	1,03
BLi04166		Carbamat-Kinase	n.b.	6,73	6,33	n.b.	0,48

Betrachtet man zunächst die Gene, welche im Zusammenhang mit der Verwertung von L-Prolin stehen, konnte sowohl für das Gen *ycgM*, welches für die Prolin-Oxidase kodiert, als auch für das die Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase kodierende Gen

ycgN, für alle Zeitpunkte eine signifikant erhöhte Expression beobachtet werden. Für das benachbarte Gen *ycgO*, dessen Produkt Ähnlichkeit mit einer Prolin-Permease aufweist, konnte eine Änderung der Expression über die Zeitreihe beobachtet werden. Diese ging mit der Verwertung von L-Prolin konform. Für die Zeitpunkte T1 bis T4 konnte eine erhöhte Expression beobachtet werden. Zum Zeitpunkt T5, bei welchem nur noch eine geringe Menge L-Prolin im Kulturüberstand zu detektieren war (vgl. Abb. 4.29), konnte keine Induktion dieses Gens beim Wachstum mit Aminosäuren beobachtet werden. Für Gene, welche an der Verwertung von L-Arginin über den Arginase Weg involviert sind, wurde ein anderes Expressionsmuster ermittelt. Das Gen der Ornithin-Aminotransferase, *rocD*, zeigte nur für die Zeitpunkte T2 bis T5 eine signifikant erhöhte Expression. Daneben konnte für das die Arginase kodierende Gen *rocF* lediglich für die Zeitpunkte T2 bis T4 eine Induktion ermittelt werden. Diese Expressionsdaten gehen insoweit mit den Analysen der Kulturüberstände konform, als zum Zeitpunkt T5 noch L-Ornithin im Gegensatz zu L-Arginin zu detektieren war (vgl. Abb. 4.27). Interessanterweise konnten, anders als bei der Verwertung einzelner Aminosäuren, beim Wachstum mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren Änderungen der Expressionsverhältnisse für Gene, die im Zusammenhang mit dem Arginin-Deiminase Weg stehen, beobachtet werden (Tab. 4.25). Der für die Arginin-Deiminase kodierende ORF BLi04163 zeigte zu allen fünf Zeitpunkten eine signifikant erhöhte Expression. Gleiches konnte für die benachbarten ORFs BLi04164, BLi04165 und BLi04166 ebenso für die Zeitpunkte T2 und T3 beobachtet werden. Anzumerken gilt es hierbei, dass für die Zeitpunkte T1 und T4 keine Expressionsdaten ermittelt werden konnten.

Ebenfalls von Interesse im Rahmen der Transkriptionsanalysen zur Verwertung eines Gemisches aus 20 Aminosäuren waren die Expressionsdaten der unter 4.3.1.2.2. vorgestellten Schnittmenge von ORFs, welche beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren eine signifikante Erhöhung der Expression zeigten (Tab. 4.26). Neben dem ORF des transkriptionalen Aktivators des Acetoin-Dehydrogenase Operons (BLi00853) konnte auch für die ORFs der Genregion BLi02106 bis BLi02102 eine erhöhte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von Aminosäuren zu allen fünf untersuchten Zeitpunkten ermittelt werden. Ebenfalls beobachtet werden konnte dieses für den ORF BLi04275, welcher für ein Homolog der L-Alanin-Dehydrogenase kodiert.

Tabelle 4.26: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen. Übersicht der unter 4.3.1.2.2. bestimmten Schnittmenge von Genen zu den Zeitpunkten T1 bis T5. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zur Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. n.b. - nicht bestimmt, put - putativ

ID	Annotation	log Expressionsverhältnisse				
		T1 / Glc	T2 / Glc	T3 / Glc	T4 / Glc	T5 / Glc
BLi00853	transkriptionaler Aktivator des Acetoin-Dehydrogenase Operons	1,45	3,79	2,20	2,26	2,40
BLi01143	α -D-Galaktosid-Galaktohydrolase	n.b.	2,94	1,93	1,72	n.b.
BLi02102	put. Enoyl(3-hydroxyisobutyryl)-Coenzyme A Hydratase-Protein	2,24	5,00	3,89	3,96	3,70
BLi02103	putative Enoyl-CoA-Hydratase	2,25	4,79	3,95	3,90	3,38
BLi02104	Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase	1,30	4,22	3,27	3,32	2,90
BLi02105	putative 2-Hydroxy-3-Oxopropionat-Reductase	2,27	5,77	4,01	4,40	4,06
BLi02106	put. Butyryl-CoA-Dehydrogenase	2,06	5,31	3,97	4,46	4,24
BLi03498	putative Pectin-Methylesterase	1,89	4,11	2,87	2,99	n.b.
BLi04275	homolog zu Ald: L-Alanin-Dehydrogenase	4,74	6,78	5,97	4,83	4,66

Während der Wachstumsuntersuchungen in definierten Medien konnte mit zunehmender Kulturdichte eine rotbraune Färbung des Mediums beobachtet werden. Bereits in einer vorangegangenen Arbeit (Veith, 2004) wurden die ORFs BLi01185 bis BLi01188 in diesem Zusammenhang erwähnt, da diese Homologien zu den Genen *iucABCD* aufweisen. Auf dem enterobakteriellen Virulenzplasmid pColV-K30 kodieren letztere für das Siderophor Aerobactin (Martinez et al., 1994). Im Rahmen der Transkriptionsanalysen der vorliegenden Arbeit konnten keine eindeutigen Genexpressionsdaten zu diesen ORFs ermittelt werden. Die Daten lassen jedoch vermuten, dass diese Gene zu den Zeitpunkten T2 und T5 beim Wachstum mit Aminosäuren induziert sind (Daten nicht gezeigt). Daneben konnte noch eine weitere

Gruppe von Genen, *dhbACEBF*, mit der Siderophorbiosynthese in Verbindung gebracht werden (Rey et al., 2004).

Tabelle 4.27: Expressionsdaten von ORFs, welche im Zusammenhang mit der Biosynthese von Siderophoren stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zur Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. n.b. - nicht bestimmt

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse				
			T1 / Glc	T2 / Glc	T3 / Glc	T4 / Glc	T5 / Glc
BLi02503	<i>fur</i>	transkript. Repressor der Eisen-Aufnahme	0,06	1,27	0,32	1,12	0,13
BLi03472	<i>yusV</i>	ähnl. zur Eisen-(III)-Dicitrat Permease	1,81	4,14	-1,04	2,06	1,64
BLi03898	<i>dhbF</i>	involviert in die 2,3-Dihydroxybenzoat Biosynthese	-0,37	4,39	n.b.	3,76	2,42
BLi03899	<i>dhbB</i>	Isochorismatase	0,96	6,97	n.b.	4,97	3,85
BLi03900	<i>dhbE</i>	2,3-Dihydroxybenzoat-AMP-Ligase	0,77	6,22	0,74	4,51	4,10
BLi03901	<i>dhbC</i>	Isochorismat-Synthase	-0,01	4,18	0,19	4,24	4,08
BLi03902	<i>dhbA</i>	2,3-Dihydroxybenzoat-2,3-Dehydrogenase	1,11	6,09	0,81	4,31	5,11
BLi03903	<i>yuiI</i>	YuiI	3,22	5,96	1,97	5,10	5,02
BLi03904	<i>feuC</i>	Eisenaufnahmesystem (Membran-Protein)	2,84	5,59	1,87	4,18	4,86
BLi03905	<i>feuB</i>	Eisenaufnahmesystem (Membran-Protein)	2,92	6,27	2,00	5,19	5,38
BLi03906	<i>feuA</i>	Eisenaufnahmesystem (bindendes Protein)	3,57	7,27	2,43	4,30	4,44
BLi03907	<i>ybbB</i>	ähnl. zum transkript. Regulator	0,27	1,48	0,55	1,69	1,00

Zusammen mit einer weiteren Anzahl von Genen sind diese in *B. subtilis* an der Biosynthese und Aufnahme des Siderophors Bacillibactin beteiligt (Miethke et al., 2006). Anhand der in Tabelle 4.27 dargestellten Transkriptionsanalysen von DSM13 ist zu erkennen, dass diese Gruppe von Genen (*dhbACEBF*) zu den Zeitpunkten T2, T4 und T5 beim Wachstum mit Aminosäuren induziert waren. Für die Gene *yuiI* und *feuABC* konnte hingegen zu allen fünf Zeitpunkten unter diesen Kultivierungsbedingungen eine erhöhte Expression ermittelt werden. Letztere Gene kodieren für die Untereinheiten eines Eisen-Aufnahme-Systems. Einschränkend muß aber hinzugefügt werden, dass es sich bei einigen der dargestellten Expressionsdaten um Einzelmessungen handelt, welche bisher noch nicht durch ein zweites biologisches Experiment nicht bestätigt werden konnten.

Im Rahmen der Genomanalyse von *B. licheniformis* DSM13 konnten vier Prophagen identifiziert werden, von denen drei in Bereichen des Genoms lokalisiert sind, in welchen nur geringe bis keine Homologien zu ORFs seines nahen Verwandten *B. subtilis* ersichtlich sind. Die Gene des vierten Prophagen weisen hingegen eine hohe Homologie zu dem PBSX Prophagen von *B. subtilis* auf (Veith, 2004). Aufgrund der teilweise nur geringen Homologien der ORFs wurden für die Transkriptionsanalysen Bereiche definiert, in welcher eine erhöhte Anzahl von ORFs im Zusammenhang mit Phagen annotiert werden konnten. Interessanterweise konnte eine Änderung der Expressionsverhältnisse für einzelne Phagenbereiche während des Wachstums mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren ermittelt werden (Tab. 7.8 im Anhang). So konnten für einen Großteil der ORFs, welche ausgehend vom Replikationsursprung des Genoms von DSM13 im Uhrzeigersinn dem ersten Phagenbereich zugeordnet wurden, reproduzierbar zum Zeitpunkt T3 eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Aminosäuren ermittelt werden. Hierbei handelt es sich ORFs, die mit dem Phagen PBSX assoziiert sind. Daneben konnte für eine Anzahl der ORFs des zweiten Phagenbereiches zwischen den Zeitpunkten T1 und T4 eine erhöhte Expression verzeichnet werden. Für phagenassoziierte ORFs, welche im dritten bzw. vierten Bereichen lokalisiert sind, konnten im Gegensatz dazu keine gesteigerten Änderungen der Expressionsverhältnisse beobachtet bzw. ermittelt werden.

4.4. Charakteristische Gene für *B. licheniformis*

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung charakteristischer Gene wurde mit der Methode des bidirektionalen BLASTs verfolgt. Zum Einsatz kam hierbei das bioinformatische Softwaretool *BiBag* (Wollherr et al., in Bearbeitung). In einem ersten Schritt werden bei dieser komparativen Methode die Aminosäuresequenzen aller proteinkodierenden Gene eines *Query*-Organismus mit den Aminosäuresequenzen einer beliebigen Anzahl von *Subject*-Organismen mittels BLASTP-Analyse (Altschul et al., 1990) miteinander verglichen. Im zweiten Schritt erfolgt die Umkehrung dieses BLASTs, d.h. die Aminosäuresequenzen der *Subject*-Organismen werden gegen die des *Query*-Organismus geblastet. Beim letzten Schritt dieser Methode werden die besten bidirektionalen Treffer zwischen *Query*- und *Subject*-Organismus herausgefiltert. Zur Validierung der Ergebnisse werden im Anschluss daran die Trefferpaare des bidirektionalen BLASTs mit Hilfe des Needleman-Wunsch-Algorithmus (Needleman & Wunsch, 1970) aligned um globale Sequenzähnlichkeitswerte zu erhalten.

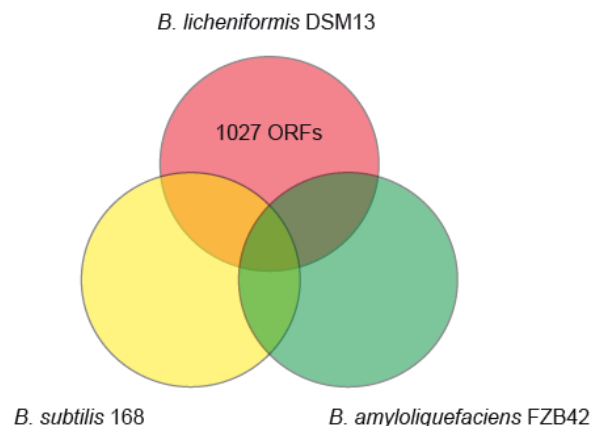


Abbildung 4.31: Schematische Darstellung des Vergleichs der Genome von *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42. Hervorgehoben sind dabei nur die Anzahl der ORFs, welche nur in DSM13 vorhanden sind.

Zunächst wurde unter Verwendung des bidirektionalen BLASTs *B. licheniformis* DSM13 mit weiteren Vertretern der *Bacillus subtilis* Gruppe verglichen (Abb. 4.31). Im Einzelnen waren dieses *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42. Der sogenannte „Heubacillus“ *B. subtilis* kommt in den oberen Schichten des Bodens vor und gehört zu den am besten charakterisierten Gram-positiven Bakterien (Kunst et al.,

1997; Barbe et al., 2009). *B. amyloliquefaciens* FZB42 ist ein mit Pflanzen assoziiertes Bakterium, welches das Potential zur Bildung von Sekundärmetaboliten wie den Polyketiden Bacillaene und Difficidin hat (Chen et al., 2007). Diese vergleichenden Untersuchungen ergaben, dass 1027 ORFs *unique* für *B. lichenformis* sind, d. h. keine Orthologe sowohl in *B. subtilis* 168, als auch in *B. amyloliquefaciens* FZB42 vorhanden sind. Ausgehend hiervon wurde anschließend die Anzahl von ORFs ermittelt, welche beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle eine signifikante Erhöhung des Expressionsverhältnisses zeigten (Tab. 4.28). Auch in diesem Zusammenhang wurde eine Änderung des *ratio of medians* um mindestens einen Faktor 3 als signifikant eingestuft. Logarithmiert zur Basis 2 entspricht dies 1,5849 bzw. -1,5849.

Tabelle 4.28: Anzahl der charakteristischen Gene für DSM13, welche beim Wachstum auf den angegebenen Aminosäuren eine signifikante Erhöhung der Expression zeigten.

Aminosäure	log Expressionsverhältnis > 1,5849
L-Alanin	31
L-Arginin	98
L-Asparagin	56
L-Aspartat	35
L-Glutamin	90
L-Glutamat	59
L-Prolin	54

In einem nächsten Schritt wurde durch vergleichende Darstellung der in Tabelle 4.28 ermittelten ORFs eine Schnittmenge von Genen gebildet, welche eine signifikant erhöhte Expression beim Wachstum mit Aminosäuren zeigten. Um, wie unter 4.3.1.2.2. bereits beschrieben, den Effekt auszuschließen, dass eine Katabolitrepression auf Glucose gewachsenen Zellen als erhöhte Expression bei Aminosäure gewachsenen Zellen interpretiert wird, wurden auch hier Daten von Transkriptionsanalysen Gluconat gewachsener Zellen vergleichend mit einbezogen. Die daraus resultierende Schnittmenge ist in Tabelle 4.29 dargestellt. Hierbei handelt es sich um ORFs, welche schon in der Schnittmenge der unter 4.3.1.2.2. bestimmten Gene mit gleicher

Genexpression beim Wachstum mit einzelnen proteinogenen Aminosäuren enthalten waren. Neben dem ORF BLi02104, welcher für eine Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodiert, sind auch die zwei angrenzenden Gene *upstream* (BLi02105, BLi02106) und *downstream* (BLi02103, BLi02102) in dieser Schnittmenge enthalten. Des Weiteren sind noch die ORFs BLi03498 und BLi04275 zu nennen. Ersterer kodiert für eine putative Pectin-Methylesterase, letzterer hingegen für ein Homolog der Alanin-Dehydrogenase.

Tabelle 4.29: Darstellung der Schnittmenge von ORFs, welche beim Wachstum mit Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle eine signifikante Erhöhung der Expression zeigten. Des Weiteren sind die Expressionsverhältnisse dieser ORFs beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol im Vergleich zum Wachstum mit Glucose angegeben. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
		Acetat / Glucose	2,3-Butandiol / Glucose
BLi02102	putative Enoyl(3-hydroxyisobutyryl)- Coenzyme A-Hydratase	3,14	3,16
BLi02103	putative Enoyl-CoA-Hydratase	3,17	2,72
BLi02104	Methylmalonat-Semialdehyd- Dehydrogenase	3,29	2,55
BLi02105	putative 2-Hydroxy-3-Oxopropionat- Reductase	3,56	3,71
BLi02106	putative Butyryl-CoA-Dehydrogenase	3,30	3,18
BLi03498	putative Pectin-Methylesterase	3,40	3,48
BLi04275	homolog zu Ald: L-Alanin- Dehydrogenase	-1,42	-1,30

Weitere Untersuchungen zeigten, dass für ein Großteil dieser Gene auch beim Wachstum mit C2-Metaboliten, wie Acetat oder 2,3-Butandiol, eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose beobachtet werden konnte (Tab. 4.29). Diente Acetat als Kohlenstoffquelle, wurde nicht nur für die ORFs BLi02106 bis BLi02102, sondern auch für den ORF BLi03498 eine mehr als dreifache Erhöhung des

log Expressionsverhältnisses ermittelt. Beim Wachstum mit 2,3-Butandiol konnte diese Steigerung ebenfalls für die ORFs BLi02102, BLi02105, BLi02106 und BLi03498 beobachtet werden. BLi02103 und BLi02104 hingegen zeigten eine mehr als zweifache Erhöhung des log Expressionsverhältnisses. Lediglich der ORF BLi04275 war sowohl beim Wachstum mit 2,3-Butandiol, als auch mit Acetat als Kohlenstoffquelle reprimiert.

Tabelle 4.30: Vergleichende Darstellung der durch *BiBag* ermittelten Sequenzähnlichkeiten.

ID	Annotation	Sequenzähnlichkeit (%)	
		<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
BLi02102	put. Enoyl(3-hydroxyisobutyryl)- Coenzyme A-Hydratase	78,8	78,8
BLi02103	putative Enoyl-CoA-Hydratase	0	0
BLi02104	Methylmalonat-Semialdehyd- Dehydrogenase	88,9	88,9
BLi02105	putative 2-Hydroxy-3- Oxopropionat-Reductase	80,1	79,1
BLi02106	putative Butyryl-CoA- Dehydrogenase	79,1	79,2
BLi03498	putative Pectin-Methylesterase	0	0
BLi04275	homolog zu Ald: L-Alanin- Dehydrogenase	84,4	84,9

Anders als in *B. subtilis* und seinen nahen Verwandten konnten diese Gene, wiederum unter Verwendung des Bioinformatikprogramms *BiBag*, in Vertretern der *Bacillus cereus* Gruppe identifiziert werden (Tab. 4.30). Exemplarisch hervorgehoben werden sollen in diesem Zusammenhang *B. weihenstephanensis* KBAB4 und *B. cereus* ATCC 14579. *B. weihenstephanensis* ist ein fakultativ psychrophiler, vornehmlich im Boden vorkommender Organismus. Der Stamm KBAB4 zeichnet sich durch den Besitz von vier Plasmiden gegenüber anderen Bacillen aus (Lapidus et al., 2008). *B. cereus* hingegen ist ein mesophiles Bodenbakterium, welches mit Lebensmittelvergiftungen im Zusammenhang steht. Beim Stamm ATCC 14579 handelt

es sich um den Typstamm von *B. cereus* (Ivanova et al., 2003). Mit Ausnahme der ORFs BLi02103 und BLi03498 konnten für die weiteren Produkte der Gene in beiden Organismen Sequenzähnlichkeiten von mehr als 78% ermittelt werden. Für den ORF BLi04275 konnte eine mehr als 84%ige und für BLi02104 sogar eine mehr als 88%ige Sequenzähnlichkeit ermittelt werden.

Setzt man einen Schwellenwert von 75% Sequenzähnlichkeit voraus, so können noch weitere 34 ORFs der insgesamt 1027 als *unique* in *B. licheniformis* ermittelten Gene sowohl in *B. weihenstephanensis* KBAB4, als auch in *B. cereus* ATCC 14579 identifiziert werden (Tab. 7.7 im Anhang). Darunter sind paraloge Gene der Arginase (BLi00198) und der Aspartase (BLi00528) zu finden, ebenso wie der ORF der putativen Formiat-Acetyltransferase (BLi02132) und dem im Genom angrenzenden Aktivierungsenzyms (BLi02131). Letztere beiden sind an der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat beteiligt (vgl. 4.1.2.1.). Eine Sequenzähnlichkeit von mehr als 80% zeigte das Gen der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase (BLi03824). Für das Gen des potenziell dazugehörigen Aktivierungsenzyms, BLi03823, konnte eine Sequenzähnlichkeit von 67,4% in *B. weihenstephanensis* KBAB4 bzw. 68% in *B. cereus* ATCC 14579 bestimmt werden. Beide Enzyme sind an der Reduktion von Ribonukleotid-Triphosphaten zu den entsprechenden Desoxyribonukleotiden beteiligt (vgl. 4.1.2.1.). Des Weiteren konnten ORFs ermittelt werden, dessen Produkt Homologie zur Isocitrat-Lyase (BLi04207) und der Malat-Synthase (BLi04208) aufweisen. Diese bilden, gemeinsam mit weiteren Enzymen des Tricarbonsäurezyklus, den Glyoxylatzyklus (vgl. 4.2.). Im Gegensatz dazu konnte jedoch für 775 ORFs der insgesamt 1027 ORFs keine Sequenzähnlichkeit in *B. weihenstephanensis* KBAB4 und *B. cereus* ATCC 14579 mittels *BiBag* festgestellt werden.

4.5. Transkriptionsanalysen im Vergleich:

PCR-basierende Genomchips vs. Oligo-basierende Genomchips

Zur Erstellung des PCR-basierenden Genomchips von *B. licheniformis* DSM13 wurden 300-500 bp große Fragmente jedes ORFs größer 300 bp amplifiziert. Hierbei gilt es anzumerken, dass 14,1% aller 4286 ORFs von DSM13 kleiner als 300 bp sind und aufgrund einer Mindestgröße der *probes* von 300 bp deshalb nicht für die

Erstellung des Genomchips berücksichtigt wurden. Somit sind letztendlich 81,5% aller in *B. licheniformis* DSM13 identifizierter ORFs auf dem PCR-basierenden Genomchip vertreten. Eine detaillierte Beschreibung der Generierung von Primern und der Amplifizierung der *probes* mittels PCR ist der Dissertation von Birgit Veith zu entnehmen (Veith, 2004). Nach dem Prinzip des Kontaktprintens erfolgte anschließend das Aufbringen der *probes* auf Aminosilan *slides* (Amersham Biosciences). Dieses so genannte Spotten erfolgte mit einem Lucidea Spotter (Amersham Biosciences) in Blöcken von Spots, wobei jeder Block zweimal auf den Chip aufgebracht wurde. Für die sich anschließende UV-Immobilisierung wurde der UVC500 UV-Crosslinker (Hoefer, San Francisco) verwendet. Die gespotteten Microarrays werden in einem Exsikkator bei Unterdruck über einem Trocknungsmittel gelagert.

Um Oligo-basierende Genomchips zu erstellen, wurden 5'-Amino-C6 modifizierte Oligonukleotide mit einer Länge von 60 bis 70 Basen von einem MicroGrid II Microarray Spotter (Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) auf CodeLink Microarray *slides* (SurModics, Eden Prairie, USA) gespottet. Das Spotten der 4177 Oligonukleotide erfolgte ebenfalls in Blöcken, wobei auch hier die Spots als Duplikat auf dem Genomchip vorlagen. Um eine einheitliche Hybridisierung sicherzustellen, wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass ihre erwartete Schmelztemperatur bei etwa 66°C liegt und sie frei von so genannten Haarnadelstrukturen sind. Ihre Spezifität für das jeweilige *target*-Gen wurde mittels BLAST-Analyse gegen alle weiteren ORFs von DSM13 überprüft. Nachdem die Oligonukleotide kovalent an die *slide*-Oberfläche gekuppelt wurden, erfolgte die Immobilisierung durch Ethanolamin. Analog den PCR-basierenden Genomchips werden auch die Oligo-basierenden Genomchips in einem Exsikkator bei Unterdruck über einem Trocknungsmittel gelagert.

Die Umstellung von PCR-basierenden Chips auf sogenannte Oligochips für die Transkriptionsanalysen ging einher mit der Änderung bzw. Optimierung der Markierungs- und Hybridisierungsbedingungen. Im Rahmen der Markierung wurde dem Ansatz nun nicht mehr *random nonamere*, sondern *hexamere* zugefügt. Verkürzt werden konnte das Annealing der Primer. Dieses erfolgte nun für 10 min bei 70°C anstelle eines PCR-Laufes. Des Weiteren wurde für die reverse Transkription ein 4/10 dNTP Nukleotid Mix und kein dCTP Nukleotid Mix verwendet. Für die Hybridisierung wurde dem Ansatz nicht mehr der *Microarray Hybridization Buffer* und

Formamid zugegeben, sondern der *Tom Freeman Hybridization Buffer*. Weitere Änderungen betrafen die Wasch- und Reinigungsschritte der Hybridisierungskammern, ebenso wie die Hybridisierung selbst. Diese erfolgt nun bei 55°C anstatt 42°C und verlängerte sich auf 15 Stunden (vgl. 3.8.).

Zunächst soll nun auf die Reproduzierbarkeit der durch Oligo-basierende DNA-Microarrays ermittelten Expressionsverhältnisse eingegangen werden. Hierzu wurde RNA aus *B. licheniformis* Zellen gewonnen, dessen Kultivierung zum einen in einem definierten Medium mit equimolarer Zugabe (10mM) der sieben proteinogenen Aminosäuren L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Glutamin, L-Glutamat und L-Prolin erfolgte und zum anderen in einem definierten Medium mit 50 mM Xylose als Kohlenstoffquelle. In einer ersten Markierungsreaktion wurde die RNA der Aminosäure gewachsenen Zellen mit dem Farbstoff Cy5 markiert und die Xylose gewachsenen Zellen mit dem Farbstoff Cy3. Die daraus ermittelten Daten für Gene, welche mit der Verwertung von Aminosäuren im Zusammenhang stehen, sind in der ersten Spalte der log Expressionsverhältnisse der Tabelle 4.31 dargestellt. Für die zwei darauf folgenden Markierungsreaktionen, dessen Werte in Spalte zwei und drei dieser Tabelle dargestellt sind, erfolgte eine Umkehrung der Farbmarkierung, ein sogenannter *dye-flip*. Der Verständlichkeit halber sind die hieraus gewonnenen Expressionsverhältnisse als reziproke Werte dargestellt. Neben dem Gen der L-Alanin-Dehydrogenase (*ald*, BLi03382) und dem ORF BLi04275, welcher für ein Homolog der L-Alanin-Dehydrogenase kodiert, konnte in den Experimenten ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression für die Gene, die im Zusammenhang mit der Verwertung von L-Arginin und L-Prolin stehen, verzeichnet werden. Namentlich sind dieses *ycgMN*, *rocD* und *rocF*. Anzumerken ist allerdings, dass für letzteres kein Wert im dritten Experiment ermittelt werden konnte. Für das Gen *ybgJ* (BLi00274), dessen Produkt Ähnlichkeit zur Glutaminase aufweist, konnte in allen drei Experimenten eine mehr als vierfache Änderung des logarithmierten Expressionsverhältnisses beobachtet werden. Auf der anderen Seite konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen keine erhöhte Expression beim Wachstum mit Aminosäuren für die ORFs BLi04139 und BLi04140 ermittelt werden. Beide ORFs, welche die Umsetzung von L-Asparagin zu Fumarat katalysieren, sind unter diesen Kultivierungsbedingungen reprimiert. Analysen des Kulturüberstandes vergleichbarer Wachstumsexperimente von DSM13 ergaben, dass zum Zeitpunkt der Ernte für die Transkriptionsanalysen kein L-Asparagin mehr im

Medium vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Im Genom konnten vier ORFs identifiziert werden, dessen Produkt Ähnlichkeit zur Aspartat-Aminotransferase aufweist. Dieses Enzym ist in der Verwertung von L-Glutamat involviert. Nur für den ORF BLi01514 konnte beim Wachstum mit einem Gemisch von Aminosäuren eine erhöhte Expression ermittelt werden.

Tabelle 4.31: Expressionsverhältnisse von Genen, welche mit der Verwertung von Aminosäuren im Zusammenhang stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von Aminosäuren, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. AS-Mix - equimolarer (10 mM) Aminosäuremix; n.b. - nicht bestimmt.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse		
			AS-Mix / Xylose	AS-Mix / Xylose	AS-Mix / Xylose
BLi00274	<i>ybgJ</i>	ähnlich zur Glutaminase	5,26	5,13	4,88
BLi00373	<i>ycgM</i>	ähnlich zur Prolin-Oxidase	5,70	6,11	5,92
BLi00374	<i>ycgN</i>	ähnlich zur Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase	5,31	5,68	5,64
BLi00422	<i>rocD</i>	Ornithin-Aminotransferase	4,78	4,72	4,64
BLi00424	<i>rocF</i>	Arginase	4,18	3,74	n.b.
BLi01514	<i>ykrV</i>	ähnlich zur Aspartat-Aminotransferase	1,79	1,52	1,63
BLi02372	<i>aspB</i>	Aspartat-Aminotransferase	-0,21	-0,39	-0,41
BLi03382	<i>ald</i>	L-Alanin-Dehydrogenase	6,79	6,01	6,06
BLi03434	<i>yurG</i>	ähnlich zur Aspartat-Aminotransferase	0,23	0,08	0,09
BLi04139		homolog zur AnsB Aspartase	-1,73	-1,69	-2,11
BLi04140	<i>ansA</i>	Asparaginase	-2,60	-2,25	-2,41
BLi04237	<i>ywfG</i>	ähnlich zur Aspartat-Aminotransferase	-0,82	-0,40	-0,49
BLi04275		homolog zur Ald Alanin-Dehydrogenase	8,06	7,64	7,97

Tabelle 4.32: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen. Übersicht der Gene des Gluconat-Operons, ermittelt durch DNA-Microarray-Technologie unter Verwendung von PCR-basierenden bzw. Oligo-basierenden Chips. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit Gluconat, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung.

n.b. - nicht bestimmt

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			Gluconat / Glucose PCR-Chip ¹⁾	Gluconat / Glucose Oligo-Chip ²⁾
BLi04286	<i>gntR</i>	transkriptionaler Repressor des Gluconat-Operons	2,91	2,72
BLi04287	<i>gntK</i>	Gluconat-Kinase	3,09	2,35
BLi04288	<i>gntP</i>	Gluconat-Permease	3,25	2,27
BLi04289	<i>gntZ</i>	6-Phosphogluconat- Dehydrogenase, decarboxylierend	n.b.	2,65

¹⁾ Veith, 2004

²⁾ repräsentative Einzelmessungen

Im Folgenden soll nun auf die Reproduzierbarkeit von Transkriptionsanalysen mit PCR-basierenden DNA-Microarrays durch Oligo-basierende DNA-Microarrays eingegangen werden. Hierzu wurden exemplarisch die Expressionsverhältnisse der Gene des Gluconat-Operons vergleichend dargestellt (Tab. 4.32). Sowohl für das Gen des transkriptionalen Repressors des Gluconat-Operons, *gntR*, als auch für die angrenzenden Gene *gntK* und *gntP* konnten die mittels PCR-basierenden DNA-Microarrays ermittelten Werte durch die Transkriptionsanalysen, in denen Oligo-basierende DNA-Microarrays verwendet wurden, verifiziert werden. Für alle genannten Gene konnte eine mehr als zweifache, in zwei Fällen sogar mehr als dreifache, Erhöhung des logarithmierten Expressionsverhältnisses beobachten werden. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zum Gluconat-Operon lagen jedoch keine Daten der PCR-basierenden DNA-Microarrays zum Gen der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, *gntZ*, vor. Aufgrund der ermittelten Werte der bereits beschriebenen Gene, kann für *gntZ* ein ähnliches Expressionsverhältnis angenommen werden. Diese Vermutung konnte durch die Transkriptionsanalysen der Oligo-basierenden DNA-Microarrays bekräftigt werden. Für letztere wurde RNA aus *B. licheniformis* Zellen gewonnen, welche in einem definierten Medium mit 50 mM Gluconat als

Kohlenstoffquelle in *batch* kultiviert wurden bzw. wie unter 3.3.5. beschrieben, als Referenzbedingung in kontinuierlicher Kultur.

4.6. Erstellung und phänotypische Charakterisierung von Mutanten

Neben Transkriptionsanalysen wurden auch molekularbiologische Arbeiten zur Erstellung von Mutanten durchgeführt, die die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen experimentell untermauern sollten und weitere Einblicke in die Regulation des Zentralstoffwechsels von *B. licheniformis* ermöglichen sollen. Von besonderem Interesse waren hierbei Gene, welche eine signifikant erhöhte Expression im Zusammenhang mit der Verwertung von Aminosäuren zeigte. Wie bereits unter 4.3.1.2.4. beschrieben, zeigte das Gen *mmgD*, welches für die Citratsynthase III kodiert, eine erhöhte Expression im Zusammenhang mit dem Wachstum auf L-Alanin, L-Arginin, L-Glutamin, L-Glutamat und L-Prolin. Lokalisiert ist dieses Gen in direkter Nachbarschaft zu den Genen eines putativen Methylcitratzyklus. Benachbart liegt weiterhin der ORF BLi04093, welcher Homologie mit Transkriptionsregulatoren der GntR-Familie besitzt (Abb. 4.32).



Abbildung 4.32: Organisation der kodierenden Gene eines putativen Methylcitratzyklus in *B. licheniformis* DSM13.

Überprüfungen der DNA-Microarray-Analysen ergaben, dass nicht nur *mmgD*, sondern auch die weiteren dem putativen Methylcitratzyklus zugeordneten ORFs beim Wachstum mit den oben angesprochenen proteinogenen Aminosäuren induziert sind (Tab. 4.33). Sowohl für den ORF des putativen transkriptionalen Regulators, als auch für die *downstream* lokalisierten Gene *mmgE* und *yqiQ* konnte eine Erhöhung der Expression beim Wachstum mit diesen einzelnen Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wachstum mit Glucose ermittelt werden.

Tabelle 4.33: Vergleichende Darstellung der Expressionsverhältnisse von Genen, welche im Zusammenhang mit einem putativen Methylcitratzyklus stehen. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit den angegebenen Aminosäuren im Vergleich zur Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Funktion	log Expressionsverhältnisse				
			Ala / Glc	Arg / Glc	Gln / Glc	Glu / Glc	Pro / Glc
BLi04093		putativer Transkriptionsregulator	2,93	2,36	1,89	2,83	1,70
BLi04094	<i>mmgD</i>	Citratsynthase III	2,67	2,04	1,64	2,71	1,89
BLi04095	<i>mmgE</i>	putative Methyloaconitat- Hydratase	2,71	1,88	1,83	2,37	1,22
BLi04096	<i>yqiQ</i>	putative Methylisocitrat- Lyase	2,78	1,62	1,56	2,27	1,21

Ähnliches konnte auch beim Wachstum auf einem Gemisch aus 20 Aminosäuren beobachtet werden. Zu dem Zeitpunkten T2 bis T5, wenn kein L-Asparagin im Kulturüberstand mehr zu detektieren war (vgl. 4.3.2.4., Abb. 4.29), konnte eine erhöhte Expression der am putativen Methylcitratzyklus beteiligten Gene im Vergleich zum Wachstum mit Glucose beobachtet werden (Tab. 4.34). Lagen hingegen zum Zeitpunkt T1 noch alle Aminosäuren im Medium vor, waren diese Gene nicht induziert.

Weitere interessante Gene wären die verbleibenden Citratsynthasen I und II. Ergebnisse der Transkriptionsanalysen der durch die Gene *citA* und *citZ* kodierten Enzyme wurden im Rahmen der Untersuchungen zu den Citratsynthasen bereits vorgestellt (vgl. 4.3.1.2.4. Abb. 4.22, 4.3.2.2. Abb. 4.26 und 4.3.2.4. Abb. Abb.30).

Tabelle 4.34: Expressionsverhältnisse von Genen, welche im Zusammenhang mit einem putativen Methylcitratzyklus stehen. Die Daten wurden zu den Zeitpunkten T1 bis T5 eines Wachstumsverlaufs in einem definierten Medium mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren ermittelt (vgl. 4.3.2.4.). Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von Aminosäuren zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zur Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Funktion	log Expressionsverhältnisse				
			T1 / Glc	T2 / Glc	T3 / Glc	T4 / Glc	T5 / Glc
BLi04093		putativer Transkriptionsregulator	-0,44	4,85	2,21	3,41	3,22
BLi04094	<i>mmgD</i>	Citratsynthase III	-0,86	4,99	2,12	3,17	2,74
BLi04095	<i>mmgE</i>	putative Methyalaconitat- Hydratase	-0,18	4,60	2,43	3,17	2,79
BLi04096	<i>yqiQ</i>	putative Methylisocitrat- Lyase	-0,41	4,21	2,01	2,59	2,20

In diesem Zusammenhang gilt es anzumerken, dass interessanterweise auch unter anaeroben Kultivierungsbedingungen im Vergleich zum aeroben Wachstum Änderungen der Expressionsverhältnisse ermittelt werden konnten (Tab. 4.35). Nicht nur für die Citratsynthase III kodierende Gen *mmgD*, sondern auch für den *upstream* angrenzenden ORF BLi04093 und die *downstream* liegenden ORFs BLi04095 und BLi04096 konnte eine signifikante Erhöhung der Expression unter anaeroben Wachstumsbedingungen beobachtet werden.

Tabelle 4.35: Expressionsverhältnisse von Genen, welche im Zusammenhang mit einem putativen Methylcitratzyklus stehen. Werte kleiner -1 bedeuten eine verstärkte Expression unter anaeroben im Vergleich zu aeroben Kultivierungsbedingungen. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Funktion	log Expressionsverhältnisse
			aerob / anaerob
BLi04093		putativer Transkriptionsregulator	-2,48
BLi04094	<i>mmgD</i>	Citratsynthase III	-2,93
BLi04095	<i>mmgE</i>	put. Methyalaconitat-Hydratase	-2,70
BLi04096	<i>yqiQ</i>	putative Methylisocitrat-Lyase	-2,93

Zur Erstellung von markerfreien *in frame* Deletionsmutanten sollte das Zielgen durch ein stark verkürztes Fragment des gleichen Gens in *B. licheniformis* mittels doppelter homologer Rekombination ausgetauscht und somit inaktiviert werden. Vorgehensweise zur Erstellung des Deletionskonstruktes, der Konjugation und anschließender Selektion sind unter 3.5 in dieser Arbeit beschrieben. Die abschließende Überprüfung auf das Vorhandensein des Deletionsvektors erfolgte mittels Southern-Blot (3.4.4.4.) Wie in Abbildung 4.33 zu sehen, bindet die Sonde spezifisch an die mitgeführte DNA des Vektors pKVM1. Sowohl beim Vektor pKVM1, als auch beim Vektor pMAD sind unspezifische Banden auf gleicher Höhe zu erkennen. Es sind jedoch keinerlei Banden bei den Mutanten bzw. Wildtyp zu beobachten.

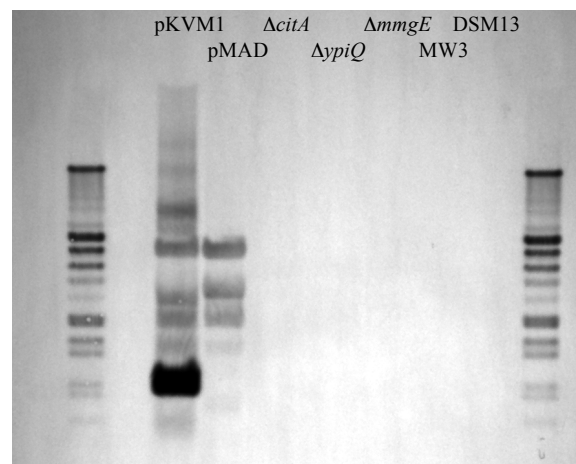


Abbildung 4.33: Darstellung eines Southern-Blots zur Überprüfung auf den Deletionsvektor.

Für eine erste phänotypische Charakterisierung lagen folgende Mutanten von *B. licheniformis* MW3 vor: Δ BLi04093, Δ mmgD, Δ mmgE, Δ yqiQ und Δ citA. In einem ersten Schritt wurden die Mutanten in einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren, welches der Sojabohne nachempfunden war, kultiviert (vgl. 3.2.2.). Um auszuschließen, dass sich Beobachtungen im Rahmen der nachfolgenden Untersuchungen auf die Deletion der beiden Typ I Restriktions-Modifikations-Systeme (Typ I RMS) von *B. licheniformis* MW3 zurückführen lassen, wurde dieser vergleichend mit dem Wildtyp DSM13 mitgeführt. Das Augenmerk lag zunächst auf den Mutanten der Citratsynthasen. Bei diesen Experimenten konnte kein signifikanter Wachstumsunterschied der Mutante Δ citA im Vergleich zu DSM13 bzw. MW3

beobachtet werden. Die Mutante $\Delta mmgD$ hingegen zeichnete sich durch ein etwas langsames diauxieähnliches Wachstum aus. Mit dem Einschwenken in die stationäre Phase erreichte sie aber eine ähnliche optische Dichte wie die anderen drei Stämme (Abb. 4.34).

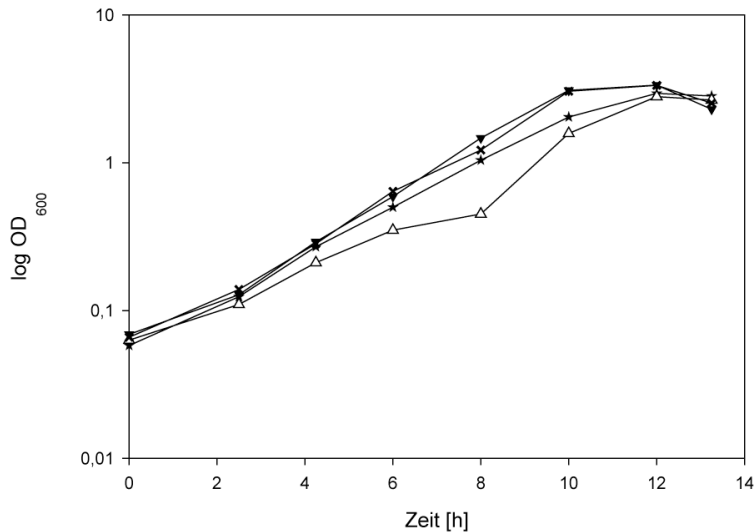


Abbildung 4.34: Vergleichende Wachstumskurven. Dargestellt ist das Wachstum von DSM13 (★), MW3 (▼), $\Delta citA$ (✕) und $\Delta mmgD$ (△) auf einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Anhand von Analysen des Kulturüberstandes konnte dieses diauxieähnliche Wachstum mit der Verwertung von Aminosäuren in Verbindung gebracht werden (Abb. 4.35). Ebenso wie der Wildtyp DSM13 verstoffwechselte auch die Mutante $\Delta mmgD$ zunächst L-Asparagin. Ein Verbrauch der verbleibenden sechs proteinogenen Aminosäuren war erst zu beobachten, als L-Asparagin in geringer Konzentration bzw. nicht mehr im Kulturüberstand zu detektieren war. Im letzteren Fall war reproduzierbar ein stark verlangsamtes Wachstum zu beobachten. Mit dem sich anschließenden signifikanten Verbrauch der sechs proteinogenen Aminosäuren ging eine zunehmende Bildung von Zellmasse einher.

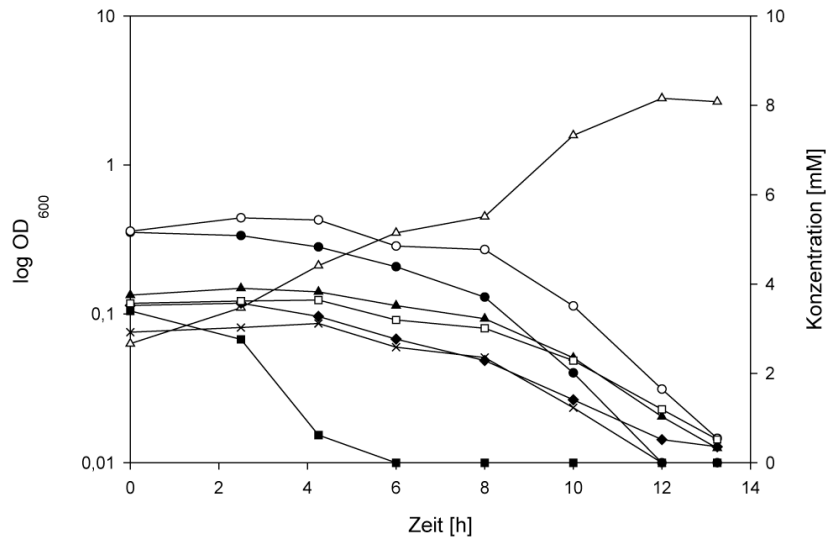


Abbildung 4.35: Wachstumsverlauf von $\Delta mmgD$ auf einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren. Dargestellt ist das Wachstum von $\Delta mmgD$ (Δ) und der Verbrauch der Aminosäuren L-Alanin (\blacklozenge), L-Arginin (\times), L-Asparagin (\blacksquare), L-Aspartat (\square), L-Glutamin (\bullet), L-Glutamat (\circ) und L-Prolin (\blacktriangle). Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

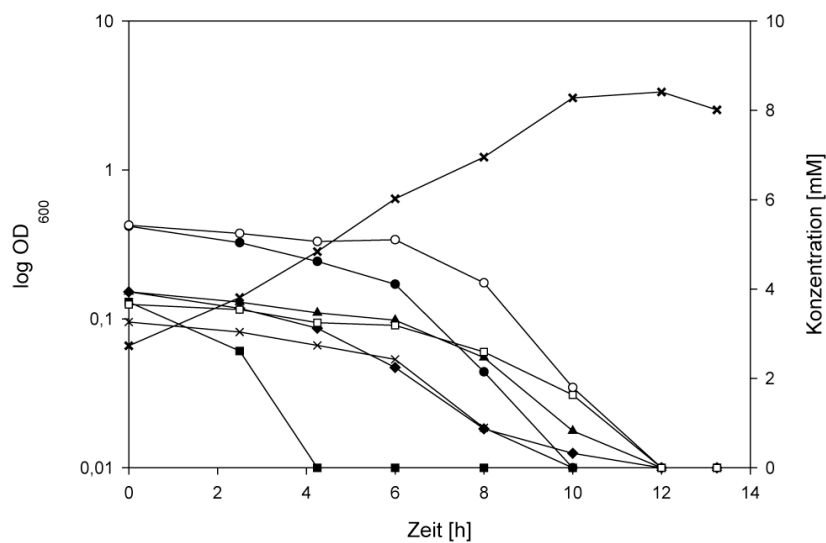


Abbildung 4.36: Wachstumsverlauf von $\Delta citA$ auf einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren. Dargestellt ist das Wachstum von $\Delta citA$ (\times) und der Verbrauch der Aminosäuren L-Alanin (\blacklozenge), L-Arginin (\times), L-Asparagin (\blacksquare), L-Aspartat (\square), L-Glutamin (\bullet), L-Glutamat (\circ) und L-Prolin (\blacktriangle). Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Eine Deletion des für die Citratsynthase I kodierenden Gens *citA* zeigte bei diesen Experimenten in einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren keinen Phänotyp. Sowohl die Daten der Wachstumskurve, als auch die Analysen der Kulturüberstände zeigten keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp DSM13 (Abb. 4.36).

Neben den Citratsynthasen waren die Gene im Zusammenhang mit dem putativen Methylcitratzyklus von Interesse. Bei der Kultivierung der verbleibenden Mutanten Δ BLi04093, Δ *mmgE*, und Δ *yqiQ* konnte kein verändertes Wachstumsverhalten in einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren im Vergleich zu DSM13 beobachtet werden (Abb. 4.37).

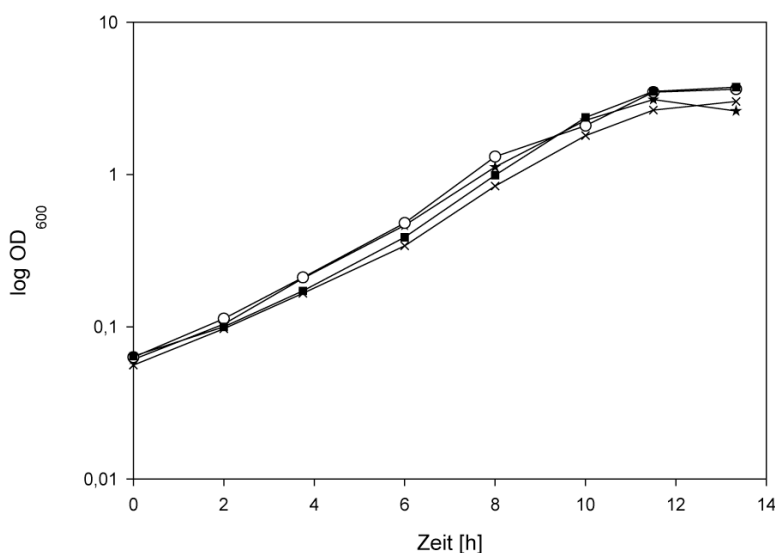


Abbildung 4.37: Vergleichende Wachstumskurven. Dargestellt ist das Wachstum von DSM13 (★), Δ BLi04093 (×), Δ *mmgE* (○) und Δ *yqiQ* (■) auf einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren. Die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

In einem weiteren Experiment wurden die Mutanten in einem definierten Medium mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle und 10 mM Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle kultiviert. Diese Untersuchungen zeigten, dass sowohl Δ *citA*, als auch Δ BLi04093, Δ *mmgE* und Δ *yqiQ* keinen Wachstumsunterschied im Vergleich zu DSM13 bzw. MW3 aufwiesen (Abb. 4.38). Die Mutante der Citratsynthase III, Δ *mmgD*, konnte hingegen weder auf Festmedium (Abb. 4.38), noch in Flüssigkultur (Daten nicht gezeigt) kultiviert werden. Ergänzend soll in diesem Zusammenhang noch erwähnt werden, dass die Mutante Δ *yqiQ* im Gegensatz zu DSM13 bzw. MW3 nicht

mehr in einem definierten Medium mit 60 mM Propionat zu kultivieren ist (Daten nicht gezeigt).

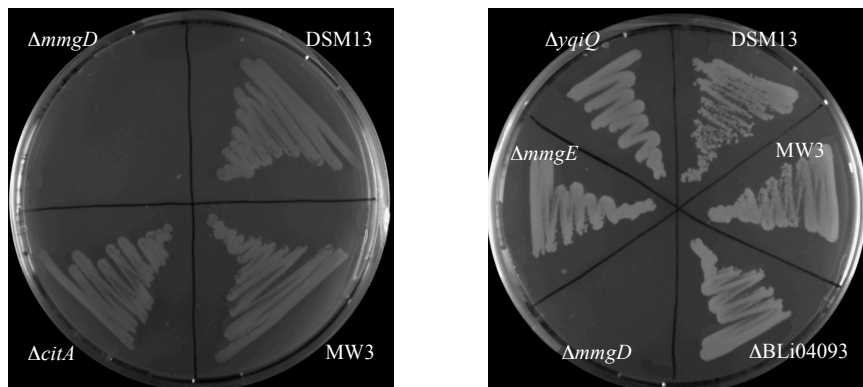


Abbildung 4.38: Vergleichende Darstellung des Wachstum von Wildtyp und Mutanten. Übersicht des Wachstums des Wildtyps und der in dieser Arbeit vorliegenden Mutanten auf einem definierten Festmedium mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle. Lediglich für die Mutante $\Delta mmgD$ konnte in diesem Zusammenhang ein Phänotyp beobachtet werden.

5. Diskussion

5.1. Wachstum von *B. licheniformis* DSM13 unter anaeroben Kultivierungsbedingungen

Anaerobe Verwertung von Zuckern

Wie bereits beschrieben, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchungen zum fermentativen Wachstum von DSM13 erneut aufgegriffen. Im Unterschied zu den vorangegangenen Arbeiten (Schwarzer, 2005) wurde das definierte Medium unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Thiamin supplementiert.

Die weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeit zum anaeroben Wachstum von *B. licheniformis* DSM13 ergaben, dass dieser keine der verwendeten Pentosen verwerten kann. Beim Wachstum in einem definierten Medium mit Hexosen konnte neben Glucose auch Fructose als Kohlenstoffquelle dienen. Des Weiteren konnte ein anaerobes Wachstum bei der Kultivierung mit Maltose und Saccharose beobachtet werden. Hierbei gilt es anzumerken, dass DSM13 in dem untersuchten Zeitraum von 50 Stunden ein schlechtes Wachstum auf Maltose zeigte (vgl. 4.1.1.).

Auf der anderen Seite ist es DSM13 möglich alle getesteten Zucker aerob als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Daneben konnte bereits gezeigt werden, dass DSM13 unter aeroben Wachstumsbedingungen sowohl Gluconat, als auch Sorbitol verwerten kann. Im Gegensatz dazu konnte DSM13 aber weder Sorbitol, noch Gluconat vergären, wobei auch die gleichzeitige Zugabe der reduzierten und der oxidierten Verbindung nicht zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen führte (Schwarzer, 2005). Dieses wiederum ließ vermuten, dass *B. licheniformis* DSM13 Probleme hat, die Redox-Bilanz unter fermentativen Bedingungen auszugleichen und deckt sich mit den Beobachtungen wie sie für den *B. licheniformis* Stamm NCIB 6346 (Shariati et al., 1995) gemacht wurden.

Gemeinsam ist den unter anaeroben Kultivierungsbedingungen als alleinige Kohlenstoffquelle dienenden Hexosen Glucose und Fructose und dem Disaccharid Saccharose, dass sie zu den sogenannten PTS-Zuckern gehören. Bei dem Phosphotransferase-System (PTS) handelt es sich um ein komplexes Enzymsystem, welches neben der Detektion und dem Transport auch für die Phosphorylierung verschiedener Zucker zuständig ist. Es besteht im Wesentlichen aus drei Komponenten.

Zusätzlich zu den generellen Komponenten HPr und Enzym I kommt eine für den jeweiligen Zucker spezifische Komponente, das Enzym II, hinzu. Das Glucose-spezifische Enzym II wird in DSM13 durch das Gen *ptsG* (BLi001598) kodiert. Direkt daneben im Genom lokalisiert sind die Gene *ptsH* (BLi01599) und *ptsI* (BLi01600). Ersteres kodiert für das HPr-Protein und letzteres für das Enzym I. Um die Flexibilität von DSM13, dass dieser neben Glucose, noch weitere Zucker anaerob zum Wachstum nutzen kann, näher zu beleuchten, soll im Weiteren auf mögliche Abbauege dieser Zucker eingegangen werden.

In *B. subtilis* sind für die Aufnahme von Fructose zwei Wege bekannt (Steinmetz, 1993). Die beteiligten Gene des ersten Aufnahmeweges sind *fruAB*. Dieser scheint auch als Hauptweg zur Aufnahme von Fructose zu dienen, da Mutationen in diesen Genen zu schlechterem Wachstum auf Fructose führen (Gay & Delobbe, 1977). Am zweiten Aufnahmeweg ist das Gencluster *levDEFG* beteiligt (Martin-Verstraete et al., 1990), welches für eine Fructose-spezifische PTS-Permease kodiert. Auch für *B. licheniformis* DSM13 konnten im Rahmen der Genomanalyse diese ORFs identifiziert werden. Hierbei kodiert *fruA* (BLi01654) für das PTS Fructose-spezifische Enzym II und *fruK* (BLi01653) für eine Fructose-1-Phosphat-Kinase. *Upstream* hiervon ist das Gen des zugehörigen transkriptionalen Repressors, *fruR* (BLi01652), lokalisiert. Das kodierende Gencluster *levDEFG* (BLi02831, BLi02830, BLi02829, BLi02828) des PTS Fructose-spezifische Enzyms II ist in DSM13 hingegen von dem Gen eines transkriptionalen Aktivators (*levR*, BLi02832) flankiert. Ebenfalls mit diesem Gencluster assoziiert ist das für eine Levanase kodierende Gen *sacC* (BLi02827).

Wie für Fructose, so sind auch für Saccharose zwei Aufnahmesysteme in *B. subtilis* beschrieben. Die am Transport und Phosphorylierung bzw. anschließender Hydrolyse beteiligten Gene des ersten Weges sind *sacA* und *sacP*. Ersteres kodiert hierbei für eine Phosphosucrase (Fouet et al., 1986) und letzteres für eine Untereinheit der Saccharose-spezifischen PTS-Permease (Fouet et al., 1987). Eine weitere Möglichkeit des Saccharose Metabolismus in *B. subtilis* kann über das Exoenzym Lvs, kodiert durch *sacB*, erfolgen. Hierbei kommt es durch den Transfer der Fructosyl-Gruppe der Saccharose zu einer Mischung aus Glucose, Fructose und Levan (Steinmetz, 1993). Die soeben beschriebenen Gene im Zusammenhang mit der Aufnahme und Umsetzung von Saccharose sind ebenfalls in DSM13 zu finden. In direkter Nachbarschaft zu den die Sucrase-6-Phosphat-Hydrolase bzw. PTS Saccharose-

spezifischen Enzyme II Komponente kodierenden Gene *sacA* (BLi04016) und *sacP* (BLi04017) ist das Gen eines zugehörigen transkriptionalen Antiterminators (*sacT*, BLi04018) lokalisiert. Weiter *downstream* hiervon befindet sich das die Levansucrase kodierende Gen *sacB* (BLi03706).

In Abbildung 5.1 sind einmal zusammenfassend die einleitenden Schritte für die Aufnahme und Verwertung bzw. die daran beteiligten Gene für Glucose, Fructose und Saccharose schematisch dargestellt. Wie soeben erörtert, lassen sowohl die genetische Ausstattung von DSM13, als auch seine Fähigkeit diese Zucker aerob, wie auch anaerob zum Wachstum nutzen zu können, vergleichbare Funktionen, wie sie für *B. subtilis* beschrieben sind, vermuten.

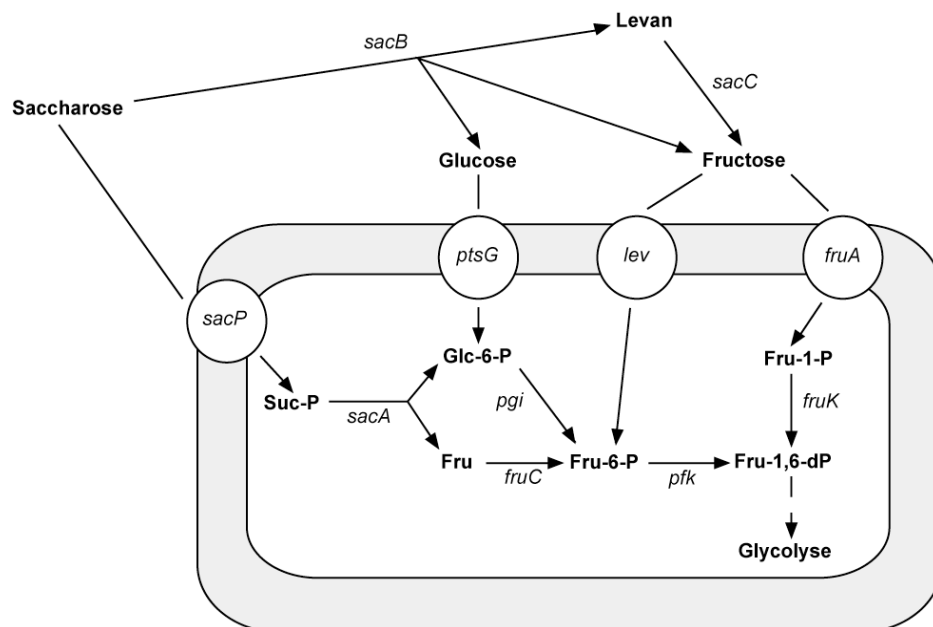


Abbildung 5.1: Schematischer Abbau von Hexosen und Saccharose in DSM13 (adaptiert und modifiziert nach *B. subtilis*, Steinmetz, 1993). Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Fru - Fructose; Fru-1-P - Fructose-1-Phosphat; Fru-1,6-dP - Fructose-1,6-Diphosphat;

Fru-6-P - Fructose-6-Phosphat; Glc-6-P - Glucose-6-Phosphat; Suc-P - Saccharose-Phosphat

Anaerobe Ribonukleotidreduktase

Im vorangegangenen Abschnitt wurden eine Reihe von Gemeinsamkeiten von *B. licheniformis* DSM13 mit seinem nahen Verwandten *B. subtilis* herausgestellt. Im Gegensatz zu DSM13 benötigt dieser aber zum anaeroben fermentativen Wachstum die zusätzliche Zugabe von Pyruvat (Nakano et al., 1997) oder Desoxyribonukleotiden

(Folmsbee et al., 2004). Letztere sind für die Synthese von DNA essentiell. Katalysiert wird ihre Bildung durch Ribonukleotidreduktasen, welche sich wiederum in drei Klassen einteilen lassen. Enzyme der Klasse I benötigen Sauerstoff, die der Klasse II agieren unabhängig vom Sauerstoff und auf Enzyme der Klasse III wirkt Sauerstoff toxisch (Torrents et al., 2000). Für die katalytische Aktivität der anaeroben Ribonukleotidreduktase ist ein Sauerstoff-sensitives Glycyl-Radikal notwendig, an dessen Generierung ein spezifisches Aktivierungsenzym beteiligt ist (Sun et al., 1995). Durch die Sequenzierung des Genoms von DSM13 konnten die Gene einer putativen anaeroben Ribonukleotidreduktase der Klasse III (BLi03824) und zwei potenziell zugehöriger Aktivierungsenzyme (BLi03823, BLi04172) identifiziert werden. Basierend auf Resultaten von Transkriptionsanalysen konnte das Aktivierungsenzym (BLi03823) der anaeroben Ribonukleotidreduktase zugeordnet werden (vgl. 4.1.2.1.). Im Genom von DSM13 ist der kodierende ORF dieses Enzyms in direkter Nachbarschaft zum Gen der Ribonukleotidreduktase lokalisiert. Des Weiteren konnte die für das Gen der anaeroben Ribonukleotidreduktase ermittelte erhöhte Expression unter fermentativen Bedingungen durch *real-time* RT-PCR verifiziert werden (vgl. 4.1.2.2.). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass via BLAST-Analyse keine anaerobe Ribonukleotidreduktase der Klasse III für *B. subtilis* ermittelt werden konnte (Folmsbee et al., 2004). Dieses steht im Einklang mit der zuvor beschriebenen Beobachtung, dass *B. subtilis* eine zusätzliche Supplementierung von Desoxyribonukleotiden für das anaerobe Wachstum benötigt. Im Gegensatz hierzu lassen die in dieser Arbeit geschilderten Experimente für DSM13 eine Aktivität der anaeroben Ribonukleotidreduktase *in vivo* vermuten.

Pyruvat-Formiat-Lyase

Dieses sehr gut in *E. coli* untersuchte Glycyl-Radikalenzym katalysiert unter Sauerstoffausschluss die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat. Die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) kann wechselseitig in einer aktiven oder inaktiven Form vorliegen. Die nur anaerob eintretende Aktivierung der PFL zur Radikaltragenden Form wird durch ein monomeres Protein, dem PFL Aktivierungs-Enzym, katalysiert (Kessler & Knappe, 1996). Die Regulation auf transkriptioneller Ebene erfolgt unter anderem durch den Redox-Regulator Fnr (Sawers & Suppmann, 1992; Kaiser & Sawers, 1995).

In *B. licheniformis* DSM13 konnten zwei ORFs identifiziert werden, welche für eine putative Pyruvat-Formiat-Lyase (BLi02132) und einem zugehörigen putativen Aktivierungsenzym (BLi02131) kodieren. Wie bereits unter 4.1.2.1. erläutert wurde das Produkt des ORFs BLi02132 als putative Formiat-Acetyltransferase annotiert. Beide ORFs sind nebeneinander im Genom von DSM13 lokalisiert und vergleichende Expressionsanalysen mittels DNA-Microarrays ergaben eine mehr als 8fache Steigerung des log Expressionverhältnisses unter fermentativen Kultivierungsbedingungen im Vergleich zu aeroben Wachstumsbedingungen (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.7). Diese Steigerung konnte für den ORF der putativen Formiat-Acetyltransferase durch *real-time* RT-PCR bestätigt werden (vgl. 4.1.2.2.). Aufgrund des Fehlens der PFL nutzt *B. subtilis* die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zum fermentativen Wachstum und produziert auch kein Formiat. Eine Mutante, welcher die Aktivität der PDH fehlt, ist nicht mehr fähig fermentativ zu wachsen (Nakano et al., 1997). Es gilt in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass unter strikt fermentativen Kultivierungsbedingungen von einem sehr schwach ausgeprägten Wachstum von *B. subtilis* zu sprechen ist. Im Gegensatz hierzu konnte eine Induktion der kodierenden Gene für die Untereinheiten dieses Enzyms in Verbindung mit anaeroben Wachstumsbedingungen für DSM13 nicht beobachtet werden (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.7). Dieses lässt den Schluss zu, dass *B. licheniformis* DSM13, wie auch *E. coli*, zum fermentativen Wachstum die PFL nutzt. Gestützt wird dieses durch die zunehmende Konzentration an Formiat im Kulturüberstand während des anaeroben Wachstums (vgl. 4.1.3., Abb. 4.7). Einen Hinweis zur Regulation dieses Enzyms in *B. licheniformis* ist in der Tatsache begründet, dass eine hoch konservierte putative Fnr *binding site* über *virtual footprint* gefunden werden konnte (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.6). Dieses geht ebenfalls mit den Beobachtungen für *E. coli* konform. Ergänzend soll noch hinzugefügt werden, dass die Umwandlung der aktiven PFL in die nichtradikale Form in *E. coli* durch das Alkohol-Dehydrogenase-Enzym AdhE katalysiert wird (Kessler et al., 1991 & 1992), wobei jedoch diese Deaktivase-Aktivität der AdhE durch erneute Untersuchungen nicht reproduziert werden konnte (Nnyepi et al., 2007).

Regulation des fermentativen Wachstums

Als Bestandteile des Regulationssystems der Adaption an das anaerobe Wachstum sind bereits das Zwei-Komponenten-System ResDE, der anaerobe Regulator Fnr und

der transkriptionale Modulator ArfM in *B. subtilis* bekannt. Hierbei kodieren *resE* für eine Histidin-Sensor-Kinase und *resD* für den zugehörigen Response-Regulator (Sun et al., 1996). Das Gen *fnr* steht im Zusammenhang mit dem Nitrat-Metabolismus unter anaeroben Wachstumsbedingungen (Cruz Ramos et al., 1995). Die Transkription von *resDE* und *fnr* sind unter anaeroben Wachstumsbedingungen in *B. subtilis* induziert (Nakano et al., 1996).

Auch im Rahmen der durchgeführten Transkriptionsanalysen zum fermentativen Wachstum in *B. licheniformis* DSM13 konnte eine erhöhte Expression für die Gene *resDE*, wie auch *fnr* beobachtet werden (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.5). Ebenfalls induziert war das Gen *arfM*, welches in *B. subtilis* an der anaeroben Induktion von den Genen der Häm-Biosynthese (*hemN* und *hemZ*) beteiligt ist (Homuth et al., 1999).

ResD und ResE sind in die Regulation von Genen der anaeroben Nitratatmung, wie *nasDEF* (Nitrit-Reduktase Operon) oder *fnr*, aber auch von Genen der Fermentation in *B. subtilis* involviert (Nakano et al., 1998; Nakano et al., 1996; Cruz Ramos et al., 2000; Nakano et al., 1997). Fnr wiederum induziert unter anaeroben Bedingungen die Transkription von *narGHIJ* (Nitrat-Reduktase, Cruz Ramos et al., 1995), *narK* (Nitrit Export, Cruz Ramos et al., 1995) und dem Gen des anaeroben Modulators ArfM (Marino et al., 2001) (Abb. 5.2). Wie bereits erläutert konnte mittels *virtual footprint* in DSM13 *upstream* von *narG*, *narK* und *arfM* potenzielle Fnr *binding sites* identifiziert werden (vgl. 4.1.2.1.). Dieses steht im Einklang mit den in *B. subtilis* gemachten Beobachtungen (Cruz Ramos et al., 1995). Es gilt anzumerken, dass die potenzielle *binding site upstream* von *narK* in DSM13 hoch konserviert vorliegt, wohingegen die *upstream* der Gene *arfM* und *narG* lokalisierten *binding sites* jeweils einen Basenaustausch enthalten (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.6). Im Zusammenhang mit dem anaeroben Wachstum konnten neben den Genen *narGHIJ* auch für *narK* und, wie schon beschrieben, auch für *arfM* eine erhöhte Expression ermittelt werden (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.5). Eine Induktion der Nitrat-Reduktase unter anaeroben Kultivierungsbedingungen, auch in Abwesenheit von Nitrat, konnte bereits 1970 für *B. licheniformis* gezeigt werden (Schulp & Stouthamer, 1970).

Wie soeben erörtert, spielt das ResDE Zwei-Komponenten-System und der Redox-Regulator Fnr beim Übergang vom aeroben zum anaeroben Wachstum in *B. subtilis* eine wichtige Rolle (Nakano & Zuber, 1998). Die Expression der Gene *cydABCD* hingegen sind in *B. subtilis* unter anaeroben Wachstumsbedingungen

unabhängig von der Regulation sowohl durch ResDE, als auch von Fnr (Ye et al., 2000). Diese Gene kodieren bzw. werden für die Expression der Cytochrom *bd* Oxidase, eine der drei großen terminalen Oxidasen, benötigt (Winstedt et al., 1998). Unter fermentativen Kultivierungsbedingungen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Induktion aller vier beteiligten Gene für DSM13 ermittelt werden (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.4). Daneben wurden keine signifikante Änderung der für die Cytochrom *caa₃* Oxidase kodierenden Gene *ctaCDEF* beobachtet. Die kodierenden Gene der dritten terminalen Oxidase, der Cytochrom *aa₃* Quinol-Oxidase (*qoxABCD*), waren unter anaeroben Wachstumsbedingungen reprimiert. Diese Ergebnisse stehen für die Gene *cydABCD* im Einklang mit DNA-Microarray-Analysen, welche in *B. subtilis* durchgeführt wurden (Ye et al., 2000). Anzumerken gilt es jedoch, dass die durchgeführten Transkriptionsanalysen in *B. subtilis*, nicht wie in dieser Arbeit in einem definierten Medium, sondern in einem komplexen Medium durchgeführt wurden. Wie eingangs erwähnt, haben die Wachstumsbedingungen bzw. Änderung dieser Bedingungen einen direkten Einfluss auf den Biosyntheseapparat eines Organismus. Aus diesem Grund können sich unterschiedliche Ergebnisse der Analysen auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückführen lassen. In diesem Kontext soll nicht unerwähnt bleiben, dass Untersuchungen in *B. subtilis* gezeigt haben, dass ResD an der Expression von *cydA* unter aeroben Bedingungen involviert ist (Puri-Taneja et al., 2007).

Zusammenfassend lassen die ermittelten Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und die Identifikation möglicher konserviert vorliegender Fnr *binding sites* darauf schließen, dass in DSM13 eine ähnliche Regulation des fermentativen Wachstums vorliegt, wie für *B. subtilis* beschrieben (Abb. 5.2). Der unter anderem aus *B. subtilis* bekannte transkriptionale Repressor Rex (ehemals YdiH; Gyan et al., 2006; Wang et al., 2008) ist ebenfalls in DSM13 zu finden. Lokalisiert ist der kodierende ORF BLi00618 in direkter Nachbarschaft zum Gen *moaC*, dessen Produkt Ähnlichkeit zu einem Vorläufer der Molybdopterin-Biosynthese hat und Genen (*tatACY*), welche für putative bzw. Komponenten des Twin-Arginin-Translokationspfads kodieren. Im Wesentlichen passt Rex die Transkription in Abhängigkeit des NADH/NAD⁺ Redoxzustandes an. Untersuchungen in *B. subtilis* lassen den Schluss zu, dass Rex ebenso als negativer Regulator der Expression von *cydABCD* dient (Schau et al., 2004) wie auch als Repressor für die Gene *ldh* und *ywcJ* (Larsson et al., 2005). Hierbei kodiert *ldh* für die bereits erwähnte Lactat-Dehydrogenase und *ywcJ* für einen putativen

Formiat-Nitrit-Transporter. Mithilfe der durchgeführten DNA-Microarrays konnte keine signifikante Änderung des Expressionsverhältnisses in DSM13 ermittelt werden. Die Intensität der einzelnen Kanäle lassen jedoch den Schluss zu, dass das Gen dieses Regulators sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Kultivierungsbedingungen induziert ist (Daten nicht gezeigt). Die Rolle des Regulatorproteins Rex im Zusammenhang mit dem fermentativen Wachstum von DSM13 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beleuchtet.

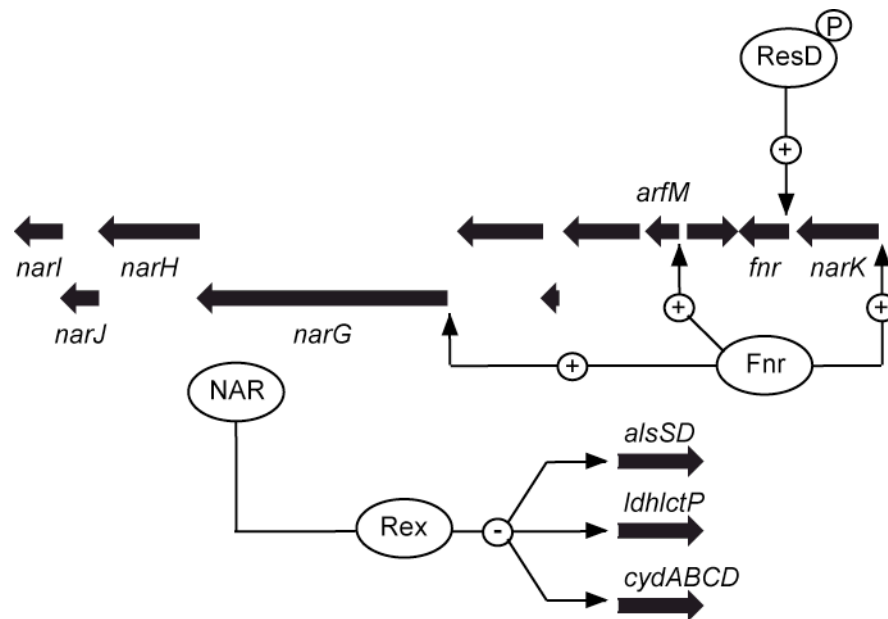


Abbildung 5.2: Vereinfachte schematische Übersicht der Regulationskaskade von Fnr für *B. subtilis* (nach Reents et al., 2006). Unter anaeroben Kultivierungsbedingungen induziert Fnr direkt die Transkription von *arfM*, *narK*, *fnr* und *narG*. Durch die Regulation der Bildung der Nitrat-Reduktase, vermittelt Fnr unter anderem die Repression von *alsSD*, *ldh lctP* und *cydABCD* durch Rex. Die Expression dieser Gene ist somit aber nicht direkt von Fnr abhängig.

Genexpression und Fermentationsendprodukte

Im Rahmen der Untersuchungen zum fermentativen Wachstum von DSM13 konnten eine Reihe von Genen aufgrund ihrer Expressionswerte der Bildung von Fermentationsendprodukten zugewiesen werden (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.8, 4.9 und 4.10). Eine Schlüsselaufgabe des fermentativen Wachstums besteht in der Reoxidation des während der Glykolyse gebildeten NADH. Dieses ist notwendig, da sonst die Oxidation der Glucose und damit verbunden die Bildung von ATP abbrechen würde. Die Regeneration des nur in geringen Mengen in der Zelle vorhandenen NAD^+ ist an verschiedene Reaktionen gekoppelt. Zum einen kann NAD^+ durch die Umwandlung

von Pyruvat zu Lactat regeneriert werden. Katalysiert wird die Reaktion durch die Lactat-Dehydrogenase. Für das kodierende Gen dieses Enzyms, *ldh*, konnte die mittels DNA-Microarray ermittelte gesteigerte Expression unter anaeroben Wachstumsbedingungen durch *real-time* RT-PCR bestätigt werden (vgl. 4.1.2.2.). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass eine Mutation in der Lactat-Dehydrogenase in *B. subtilis* zu schlechtem Wachstum unter anaeroben Bedingungen führt (Cruz Ramos et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Regeneration ist an die Bildung von 2,3-Butandiol gekoppelt. Wiederum ausgehend vom Pyruvat wird dieses zunächst durch die α -Acetolactat-Synthase (*alsS*) und α -Acetolactat-Decarboxylase (*alsD*) zu Acetoin umgesetzt. Die anschließende Reduktion von Acetoin zu 2,3-Butandiol wird durch die Acetoin-Reduktase katalysiert. Sowohl für die Gene *alsSD*, als auch für den ORF der putativen Acetoin-Reduktase BLi02066 konnte eine erhöhte Expression bei fermentativen Wachstum von DSM13 beobachtet werden (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.8). Mittels *real-time* RT-PCR konnte dieses am Beispiel der Gens *alsD* verifiziert werden (vgl. 4.1.2.2.). Eine Mutation in *alsSD* hat, im Gegensatz zu der bereits erwähnten Mutation der Lactat-Dehydrogenase, keine Auswirkung auf das Wachstum von *B. subtilis* unter anaeroben Bedingungen (Cruz Ramos et al., 2000). Eine Disruption des Gens des zugehörigen transkriptionalen Regulators, *alsR*, führt hingegen dazu, dass das *alsSD* Operon nicht mehr exprimiert wird (Renna et al., 1993).

Die zwei wesentlichen Synthesewege von Glycerol beginnen mit dem glycolytischen Intermediat Dihydroxyacetonphosphat, unterscheiden sich jedoch in der Dephosphorylierung und Reduktion (Skraly & Cameron, 1998). Involviert in diese katalytischen Schritte sind Glycerol-Dehydrogenasen. Im Genom von DSM13 konnten vier Gene identifiziert werden, dessen Produkte in Verbindung mit Glycerol-Dehydrogenasen annotiert wurden. Anhand der durchgeführten DNA-Microarray-Analysen wurden nur für die ORFs BLi00996 und BLi04259 eine erhöhte Expression beim Wachstum unter anaeroben Kultivierungsbedingungen im Vergleich zum aeroben Wachstum beobachtet (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.9). Eine Verifizierung der ermittelten Daten für den ORF BLi00996 erfolgte via *real-time* RT-PCR (vgl. 4.1.2.2.). Im Genom von *B. licheniformis* DSM13 ist der ORF BLi00996 (*glpD*) mit Genen (*glpPFK*) assoziiert, welche wiederum in *B. subtilis* mit der Verwertung von Glycerol in Verbindung stehen (Lindgren & Rutberg, 1975). Unter den gegebenen fermentativen Versuchsbedingungen

konnte für *B. licheniformis* keine erhöhte Expression dieser Gene ermittelt werden (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.9). Dieses lässt vermuten, dass sowohl die Gene *glpPFK*, ebenso wie *glpD*, auch in DSM13 primär an der Verwertung von Glycerol beteiligt sind.

In direkter Nachbarschaft zum obig erwähnten ORF BLi04259 ist ein ORF lokalisiert, dessen Produkt für eine putative D- α -Glycerophosphatase kodiert. Ein solches Enzym konnte bereits in *B. licheniformis* aufgereinigt und charakterisiert werden (Skraly & Cameron, 1998). Es katalysiert den finalen Schritt zur Bildung von Glycerol, indem es D-Glycerolphosphat zu Glycerol dephosphoryliert. Der komplette biosynthetische Weg zum Glycerol ist in *B. licheniformis* nicht bekannt (Skraly & Cameron, 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten gesteigerten Expressionswerte für DSM13 beim Wachstum unter fermentativen Kultivierungsbedingungen lassen vermuten, dass sowohl der für eine putative Glycerol-1-Phosphat-Dehydrogenase kodierende ORF BLi04259, als auch der für eine putative D- α -Glycerophosphatase kodierende ORF BLi04260 in die Biosynthese von Glycerol involviert sind (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.9).

Wie bereits beschrieben, katalysiert die PFL, ausgehend von Pyruvat, die Umsetzung zu Formiat und Acetyl-CoA, ohne dabei, wie die Pyruvat-Dehydrogenase, nochmals zwei NADH zu produzieren. Acetyl-CoA kann anschließend einerseits, unter Bildung von ATP, zu Acetat umgewandelt oder andererseits zu Ethanol reduziert werden. Durch die Bildung von Ethanol in zwei Reduktionsschritten können zwei Moleküle NAD⁺ regeneriert werden. Typischerweise werden diese Reduktionen von zwei verschiedenen Enzymen, der Acetaldehyd-Dehydrogenase und der Alkohol-Dehydrogenase katalysiert, wobei jedoch Untersuchungen in *E. coli* gezeigt haben, dass ein großes Hybridenzym beide Reaktionen katalysieren kann (Goodlove et al., 1989; Kessler et al., 1991). Hierbei handelt es sich um die bereits im Zusammenhang mit der Pyruvat-Formiat-Lyase erwähnte Ethanol-Dehydrogenase, welche durch das Gen *adhE* kodiert wird. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptionsanalysen wurden die vergleichenden Genexpressionen von neun möglichen Kandidaten putativer Alkohol-Dehydrogenasen untersucht (vgl. 4.1.2.1., Tab. 4.10). Für zwei dieser ORFs, BLi01117 und BLi04290, konnte eine signifikante Expressionserhöhung unter anaeroben Wachstumsbedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen ermittelt werden. Anders als der ORF BLi01117 kodiert BLi04290 für eine putative bifunktionale Acetaldehyd-CoA/Alkohol-Dehydrogenase. Eine auf Aminosäureebene

durchgeführte BLAST-Analyse ergab eine mehr als 50%ige Übereinstimmung mit der multifunktionalen AdhE aus *E. coli* K12 (Daten nicht gezeigt).

Neben der Reduktion zu Ethanol kann Acetyl-CoA aber auch zu Acetat umgesetzt werden. Zunächst wird hierbei Acetyl-CoA durch die Phosphotransacetylase (*pta*) zu Acetyl-Phosphat umgesetzt (Presecan-Siedel et al., 1999). In einem durch die Acetat Kinase (*ackA*) katalysierten Schritt wird dieses anschließend unter Bildung von ATP zu Acetat umgewandelt. Wie bereits für die Mutation der Lactat-Dehydrogenase beschrieben, kommt es auch bei einer *pta*-Mutante zu vermindertem Wachstum unter anaeroben Bedingungen bei *B. subtilis* (Cruz Ramos et al., 2000). Die in DSM13 durchgeführten vergleichenden Analysen der Genexpression ergaben, dass die an beiden Reaktionen beteiligten Gene, *pta* und *ackA*, unter anaeroben Wachstumsbedingungen reprimiert waren. Dieses konnte mittels *real-time* RT-PCR für das Gen der Acetat-Kinase bestätigt werden (vgl. 4.1.2.2.). Im Zuge der Analysen des Kulturüberstandes konnte jedoch Acetat sowohl qualitativ, als auch quantitativ nachgewiesen werden (vgl. 4.1.3.). Eine Erklärungsmöglichkeit dieser Beobachtung ist, dass die beteiligten Gene zwar unter aeroben Kultivierungsbedingungen gesteigert, jedoch auch unter fermentativen Wachstumsbedingungen, transkribiert werden. DNA-Microarray-Analysen geben die Verhältnisse von Genexpressionen an, hierzu ist jedoch eine Transkription der zu untersuchenden Gene unter beiden gewählten Versuchsbedingungen notwendig. In diesem Zusammenhang gilt es zu erwähnen, dass die Synthese der α -Acetolactat-Synthase (*alsS*) in *B. subtilis* durch Acetat im Medium induziert wird (Holtzclaw & Chapman, 1975). Ebensolches ist auch für Enterobakterien beschrieben worden (Böck & Sawers, 1996).

Zusammenfassend kann also noch mal erläutert werden, dass die Transkriptionsanalysen des fermentativen Wachstums in *B. licheniformis* DSM13 gezeigt haben, dass Gene, welche an der Synthese von Fermentationsprodukten beteiligt sind, unter anaeroben Bedingungen gesteigert transkribiert wurden. Lediglich die Gene *pta* und *ackA*, welche an der Bildung von Acetat beteiligt sind, bilden hier eine Ausnahme. Alle in diesem Zusammenhang beschriebenen möglichen Fermentationsendprodukte konnten im Kulturüberstand von anaerob kultivierten *B. licheniformis* Zellen detektiert werden. Neben der qualitativen Bestimmung von Acetoin und Ethanol, konnten sowohl die Hauptfermentationsprodukte 2,3-Butandiol und Formiat, wie auch Lactat, Glycerol und Acetat quantitativ bestimmt werden (vgl.

4.1.3.). Basierend auf der Konzentration des am zweithäufigsten gebildeten Endproduktes neben 2,3-Butandiol können Organismen in diol-H₂ Produzenten, diol-Glycerol Produzenten und diol-Formiat Produzenten eingeteilt werden (Böck & Sawers, 1996). Aufgrund der Analysen der Kulturüberstände fermentativ kultivierter Zellen, kann man DSM13 letzterer Gruppe zuordnen.

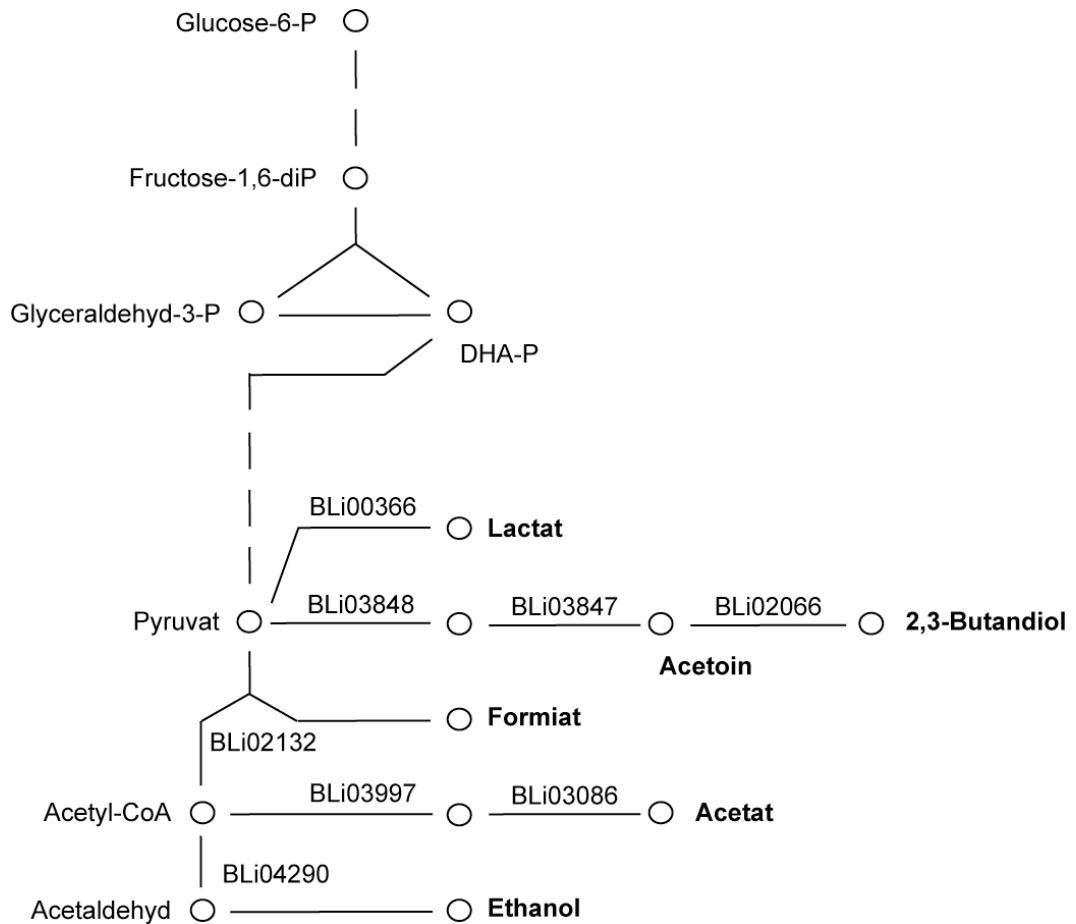


Abbildung 5.3: Darstellung von Genen, welche an der Produktion von Fermentationsendprodukten beteiligt sind. Die Zuordnung basiert auf den in den Transkriptionsanalysen ermittelten Genexpressionswerten. Fermentationsprodukte sind fett hervorgehoben. BLi00366, Lactat-Dehydrogenase; BLi03848, α -Acetolactat-Synthase; BLi03847, α -Acetolactat-Decarboxylase; BLi02066, Acetoin-Reduktase; BLi02132, putative Formiat-Acetyltransferase / putative Pyruvat-Formiat-Lyase; BLi03997, Phosphotransacetylase; BLi03086, Acetat-Kinase; BLi04290, Alkohol-Dehydrogenase/Acetaldehyd-Dehydrogenase

In Abbildung 5.3 sind einmal zusammenfassend alle an der Bildung von den im Rahmen dieser Arbeit detektierten Fermentationsprodukten beteiligten Gene dargestellt. Grundlage dieser Zuordnung bilden die in den vergleichenden Genexpressionsanalysen ermittelten Daten. Der genaue Reaktionsmechanismus zur Bildung von Glycerol bedarf noch weiterer Untersuchungen und ist aus diesem Grund hier nicht im Zusammenhang mit der gemischten Säuregärung abgebildet.

5.2. Wachstum mit C2-Metaboliten

Zusammen mit weiteren Enzymen des Tricarbonsäurezyklus bilden die putative Isocitrat-Lyase (BLi04207) und die putative Malat-Synthase (BLi04208) den anaplerotischen Glyoxylatzyklus, welcher Organismen dazu befähigt auf C2-Metaboliten zu wachsen. Die Isocitrat-Lyase spaltet zunächst Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat. Durch die katalytische Aktivität der Malat-Synthase kondensiert letzteres mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu Malat (Abb. 5.4). Hieraus kann wiederum ein zusätzliches Molekül Oxalacetat gebildet werden, welches für biosynthetische Reaktionen zur Verfügung steht.

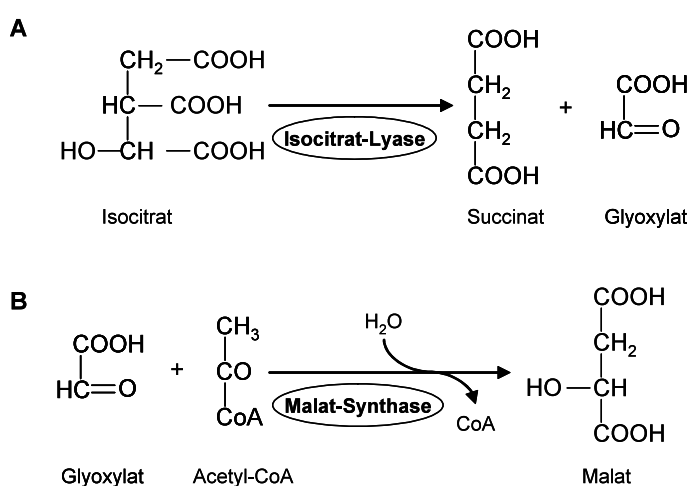
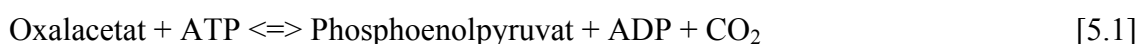


Abbildung 5.4: Anaplerotische Reaktionen des Glyoxylatzyklus. **A** Spaltung von Isocitrat durch die Isocitrat-Lyase in Succinat und Glyoxylat. **B** Synthese von Malat aus Glyoxylat und Acetyl-CoA durch die Malat-Synthase (Veith, 2004).

Eine Induktion des Glyoxylatzyklus wird in Gram-negativen Organismen wie *Rhodobacter capsulatus* oder *E. coli* durch Acetat oder langkettige Fettsäuren als einziger C-Quelle beschrieben (Blasco et al., 1991; Vanderwinkel et al., 1963). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte im Gram-positiven Organismus *C. glutamicum* eine Induktion der Isocitrat-Lyase und der Malat-Synthase durch Acetat als einziger C-Quelle, aber auch durch Acetat im Gemisch mit weiteren C-Quellen gezeigt werden (Reinscheid et al., 1994a; Reinscheid et al., 1994b). *B. subtilis* hingegen scheint keinen Glyoxylatzyklus zu besitzen, da entsprechende Gene nicht im Genom vorhanden sind und dieser nicht in der Lage ist mit Acetat als einziger C-Quelle zu wachsen. Des Weiteren konnte keine Aktivität der Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase nachgewiesen werden (Sonenshein, 2002). Die Synthese dieser beiden Gene konnte hingegen für *Bacillus stearothermophilus* belegt werden (Chell & Sundaram, 1975).

B. licheniformis DSM13 ist in der Lage sowohl mit Acetat, als auch mit 2,3-Butandiol als C-Quelle zu wachsen und im Rahmen der hierzu durchgeführten Transkriptionsanalysen konnten ähnliche Expressionsmuster für das Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol ermittelt werden (vgl. 4.2.). Im Vergleich zur Kultivierung mit Glucose waren neben den bereits angesprochenen ORFs BLi04207 (Isocitrat-Lyase) und BLi04208 (Malat-Synthase) ebenfalls die Gene *pckA*, *acsA* und *citB* sowohl beim Wachstum mit Acetat, als auch mit 2,3-Butandiol induziert.

Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (EC 4.1.1.49), kodiert durch *pckA* (BLi03197), katalysiert die Bildung von Phosphoenolpyruvat (PEP) aus Oxalacetat und ATP [5.1]. Alle Reaktionen der Glykolyse zwischen PEP und dem Fructose-1,6-bisphosphat sind reversibel. Somit stellt PEP den Vorläufer der Gluconeogenese dar (Gottschalk, 1986), in welcher das Grundgerüst für die Synthese von Vitaminen oder Nukleinsäuren entsteht.



In diesem Kontext gilt es zu erwähnen, dass zwei mögliche Wege zur Aktivierung von Acetat beschrieben wurden. Zum einen kann die Synthese von Acetyl-CoA, ausgehend vom Acetat, über das Zwischenprodukt Acetylphosphat von der Acetat-Kinase (*AckA*) und der Phosphotransacetylase (*Pta*) erfolgen. Der zweite, direkte Weg wird durch die Acetyl-CoA-Synthetase (*AcsA*) katalysiert (Abb. 5.5). Gemeinsam mit

den Genen des Glyoxylatzyklus (*aceA*, *aceB*) werden in *C. glutanicum* *ackA* und *pta* induziert (Wendisch et al., 1997). Die in DSM13 durchgeführten Transkriptionsanalysen deuten hingegen auf eine Aktivierung des Acetats durch die Acetyl-CoA-Synthetase (*AcsA*) hin (vgl. 4.2.). Dieses deckt sich mit Beobachtungen die sowohl in *E. coli*, als auch in *B. subtilis* gemacht wurden. Die Acetataktivierung erfolgt in *E. coli* ebenfalls hauptsächlich durch die Acetyl-CoA-Synthetase (Brown et al., 1977; Oh et al., 2002). Auch wenn *B. subtilis* nicht in der Lage ist mit Acetat als einziger C-Quelle zu wachsen, so konnte dennoch durch Inaktivierung des kodierenden Gens *acsA* gezeigt werden, dass die Acetyl-CoA-Synthetase in die Verwertung von Acetat involviert ist (Grundy et al., 1993b).

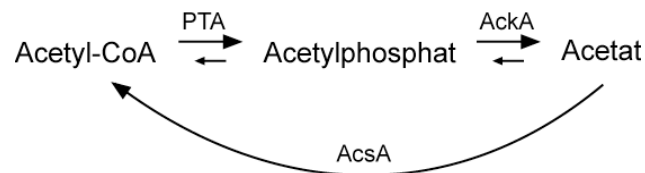


Abbildung 5.5: Aktivierung von Acetat in DSM13. Basierend auf der komparativen Genexpressionsanalyse beim Wachstum mit Acetat bzw. Glucose. Erläuterung im Text (adaptiert von *B. subtilis*, Grundy et al., 1993a).

Die ersten drei Enzyme des Tricarbonsäurezyklus katalysieren die Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat und die anschließende Isomerisierung und Oxidation von letzterem zu 2-Oxoglutarat. Die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat wird hierbei von der Aconitat-Hydratase katalysiert. In *B. subtilis* wird dieses durch *citB* kodierte Enzym durch Citrat bzw. Vorläufern von Citrat, wie Aspartat, induziert (Ohné, 1974). Die synergistische Repression des Enzyms durch Glucose und Glutamat wird mit einer *upstream* des Promoters liegenden Region assoziiert (Fouet et al., 1990; Fouet & Sonenshein, 1990; Rosenkrantz et al., 1985). Daneben lassen Untersuchungen vermuten, dass 2-Oxoglutarat bzw. N-Quellen, welche zu 2-Oxoglutarat umgewandelt werden können, ebenfalls in die Regulation des *citB*-Gens involviert sind (Blencke et al., 2006; Fisher & Magasanik, 1984). Die Transkriptionsanalysen in DSM13 haben eine erhöhte Expression von *citB* beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol im Vergleich zur Kultivierung mit Glucose gezeigt (vgl. 4.2.). Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob diese Induktion auf Citrat zurückzuführen ist, da sowohl Acetat, als

auch 2,3-Butandiol über Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus einmünden, oder ob es sich um den Effekt der Repression unter Referenzbedingungen handelt. Ergänzend muss hinzugefügt werden, dass in vorangegangenen analogen Experimenten keine erhöhte Expression dieses Gens beobachtet wurde (Veith, 2004).

Der Katabolismus von Acetoin wurde in einer Reihe von Acetoinverwertenden Bakterien, wie *Pelobacter carbinolicus* (Oppermann et al., 1991; Oppermann & Steinbüchel, 1994), *Clostridium magnum* (Krüger et al., 1994), *Klebsiella pneumoniae* (Deng et al., 1994) oder auch *Alcaligenes eutrophus* (Priefert et al., 1991) charakterisiert. Gemeinsam ist diesen Organismen, dass der Acetoin-Abbau durch das Acetoin-Dehydrogenase Enzymsystem (AoDH ES) katalysiert wird. Dieses besteht aus der Thiamin PP_i abhängigen Acetoin-Dehydrogenase (AoDH E1), der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase (AoDH E2) und der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (AoDH E3) (Oppermann et al., 1991; Oppermann & Steinbüchel, 1994). Die strukturellen Gene des Acetoin-Dehydrogenase Enzymsystems *acoA* (α -Untereinheit von AoDH E1), *acoB* (β -Untereinheit von AoDH E1), *acoC* (AoDH E2) und *acoL* (AoDH E3) sind in *P. carbinolicus* (Oppermann & Steinbüchel, 1994), *C. magnum* (Krüger et al., 1994) und *K. pneumoniae* (Deng et al., 1994) in einem Gencluster angeordnet.

Unter den Genen, welche im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Microarray-Analysen ebenfalls beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol induziert waren, konnten eben diese Gene *acoABCL* identifiziert werden. Im Genom von DSM13 ist auch noch das *acuABC* Gencluster vorhanden, das am Acetoin-Abbau beteiligt zu sein scheint. Lokalisiert ist dieses in direkter Nachbarschaft zum Gen der Acetyl-CoA-Synthetase (*acsA*). Beide Gencluster weisen in *B. subtilis* keine Ähnlichkeit zueinander auf (Huang et al., 1999) und die Rolle von *acuA* scheint in einer Modifikation der Acetyl-CoA-Synthetase zu bestehen. Eine Inaktivierung von *acuA* führt zur schlechteren Verwertung von Acetoin (Grundy et al., 1993b), die Inaktivierung von *acoA* hingegen bringt die Acetoinverwertung zum Erliegen. Diese führt zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei der von den *aco*-Genen kodierte Acetoin-Dehydrogenase um das essentielle Enzym des Acetoin-Abbaus handelt (Huang et al., 1999). Weiterführende Studien haben gezeigt, dass die Transkription des *aco*-Operons in *B. subtilis* in Gegenwart von Acetoin induziert und abhängig von AcoR und dem Sigmafaktor L (SigL) ist (Ould Ali et al., 2001). In der DNA-Sequenz von

B. licheniformis DSM13 konnte ebenfalls die Consensussequenz des SigL (BLi03678) Bindemotivs (Helmann & Moran, 2002) vor dem Gen *acoA* ermittelt werden (Veith, 2004). Zusammenfassend lassen die erläuterten Untersuchungen einen ähnlichen Regulationsmechanismus wie er für *B. subtilis* beschrieben ist, auch in DSM13 vermuten.

Der einleitende Schritt zur Verwertung von 2,3-Butandiol wird durch die Butandiol-Dehydrogenase katalysiert. In früheren Untersuchungen wurden mögliche Kandidaten einer Butandiol-Dehydrogenase aufgrund ihrer Genexpression beschrieben (Veith, 2004). Es konnte jedoch keine Übereinstimmung mittels BLAST-Analyse sowohl auf Nukleotid- wie Aminosäureebene mit der in *B. subtilis* (Nicholson, 2008) beschriebenen Butandiol-Dehydrogenase in DSM13 ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen in *Aerobacter aerogenes* haben hingegen gezeigt, dass die Acetoin-Reduktase bei einem hohen NAD^+/NADH -Verhältnis auch als Butandiol-Dehydrogenase agieren kann (Böck & Sawers, 1996). Unter den gewählten Versuchsbedingungen für die Transkriptionsanalysen in DSM13 konnte keine Induktion des ORFs der Acetoin-Reduktase (BLi02066) beim Wachstum mit 2,3-Butandiol beobachtet werden (vgl. 4.2.4., Abb. 4.12). Analysen des Kulturüberstandes vergleichbarer Experimente lassen vermuten, dass DSM13 zum Zeitpunkt der Zellernte für die RNA-Präparation kein bzw. nur geringe Mengen 2,3-Butandiol zur Bildung von Zellmasse nutzt. Es konnte hingegen ein Verbrauch des zuvor akkumulierten Acetoin detektiert werden (vgl. 4.2.3., Abb. 4.11). Hiermit geht die bereits erläuterte Induktion der Gene des *aco*-Operons und des zugehörigen transkriptionalen Aktivators beim Wachstum mit 2,3-Butandiol konform.

Ergänzend soll in diesem Zusammenhang noch erwähnt werden, dass die anhand von vorangegangenen PCR-basierenden Transkriptionsanalysen ermittelte erhöhte Expression, sowohl beim Wachstum mit Acetat, als auch beim Wachstum mit 2,3-Butandiol, im Rahmen dieser Arbeit in vergleichbar durchgeführten Experimenten, in denen Oligo-basierende DNA-Microarrays zum Einsatz kamen, für eine Auswahl an Genen reproduziert werden konnten (siehe Tab. 7.10 im Anhang, vgl. Veith, 2004). In diesem Kontext wurden lediglich die Ergebnisse des für die Aconitat-Hydratase kodierende Gen *citB* nicht bestätigt. Diese Ergebnisse unterstreichen nochmals die bereits unter 4.5. beschriebene Reproduzierbarkeit von DNA-Microarray-Analysen. Die qualitativ deutliche Erhöhung der Genexpression der Isocitrat-Lyase und der Malat-

Synthese wurde bereits unter Einsatz der *real-time* RT-PCR für das Wachstum mit Acetat im Vergleich zum Wachstum mit Glucose verifiziert (Veith, 2004).

5.3. Wachstum mit Aminosäuren

Aminosäuren bzw. Gemische von diesen können unter verschiedenen Bedingungen als Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle für das bakterielle Wachstum dienen. Der Verbrauch der einzelnen Aminosäure ist von verschiedenen Parametern, wie der Verfügbarkeit weiterer Energiequellen oder des Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisses abhängig. Um diese Thematik näher zu beleuchten wurde ein definiertes Medium zusammengestellt, welches in der Zusammensetzung der Aminosäuren der Sojabohne nachempfunden war. Zuvor wurde jedoch untersucht, welche proteinogenen Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können. Wachstumsexperimente haben gezeigt, dass *B. licheniformis* DSM13 sieben der 18 untersuchten proteinogenen Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle verwenden kann (vgl. 4.3.1.1.). Diese waren im Einzelnen L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Glutamin, L-Glutamat und L-Prolin. Weiterhin war es DSM13 möglich die nicht-proteinogene Aminosäure L-Ornithin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle zu nutzen (Daten nicht gezeigt). Anhand von Transkriptionsanalysen beim Wachstum mit diesen einzelnen Aminosäuren bzw. Gemischen von Aminosäuren wurden erhöhte Expressionswerte von Genen die im Zusammenhang mit ihrer Verwertung stehen verzeichnet. Basierend hierauf wurden die Aminosäuren bezüglich ihres Einmündens in den Zentralstoffwechsel in Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe enthält L-Alanin, die zweite Gruppe besteht aus L-Asparagin und L-Aspartat. Aminosäuren, welche wiederum über L-Glutamat in den Zentralmetabolismus einmünden, können in einer dritten Gruppe zusammengefasst werden. Unter Berücksichtigung der proteinogenen Aminosäuren sind dieses L-Glutamin, L-Glutamat, L-Arginin und L-Prolin. Letztere beiden nehmen aufgrund ihres gemeinsamen Intermediaten Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat eine Sonderstellung ein.

L-Alanin

Der Abbau von L-Alanin zu Pyruvat und Ammoniak wird von der L-Alanin-Dehydrogenase (*ald*) katalysiert. Induziert wird diese in *B. subtilis* und *B. licheniformis* durch die Zugabe von Alanin zum Medium (Berberich et al., 1968, McCowen & Phibbs, 1974, Schreier et al., 1982). Daneben können aber noch zusätzlich 10 weitere L-Aminosäuren, sowie 11 D-Aminosäuren dieses Enzym in *B. subtilis* induzieren. Unter diesen 10 L-Aminosäuren sind neben den verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin, auch Threonin und Methionin zu finden. Nach Berberich et al. resultiert die Induktion von *ald* durch die weiteren Aminosäuren dabei durch die Umwandlung dieser entweder zu L-Alanin oder D-Alanin durch Transamination (Berberich et al., 1968). Die eigentliche Induktion scheint jedoch durch D-Alanin zu erfolgen, da nur durch D-Alanin und die weiteren D-Aminosäuren die Expression von *ald* in einer Alanin-Racemase Mutante induziert wird (Fisher, 1993). Das Enzym Alanin-Racemase wandelt Alanin von der L- in die D-Konfiguration um. *Salmonella typhimurium* kann L-Alanin sowohl als alleinige Kohlenstoffquelle, als auch als alleinige Stickstoffquelle nutzen. *E. coli* hingegen kann sowohl L-Alanin, als auch D-Alanin als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (McFall & Newman, 1996). L-Alanin wird zunächst durch eine spezifische Racemase zu D-Alanin umgewandelt und letzteres, katalysiert durch eine D-Aminosäure-Dehydrogenase, zu Pyruvat und Ammonium umgesetzt (McFall & Newman, 1996).

Auch für *B. licheniformis* DSM13 konnte eine erhöhte Expression von *ald* im Zusammenhang mit der Verwertung von L-Alanin beobachtet werden. Daneben konnte durch die DNA-Microarray-Analysen zusätzlich noch eine Induktion dieses Genes beim Wachstum mit L-Asparagin, L-Arginin, L-Prolin und L-Ornithin ermittelt werden (vgl. 4.3.1.2.1., Tab. 4.14). Beim Wachstum mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren konnte ebenfalls eine Induktion von *ald* in Verbindung mit einem gesteigerten Verbrauch von L-Alanin beobachtet werden. Der für ein Homolog der L-Alanin-Dehydrogenase kodierender ORF BLi04275 hingegen war konstitutiv induziert. Es konnte nicht nur beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren, sondern auch zu allen gewählten Zeitpunkten bei der Kultivierung mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren eine erhöhte Expression im Vergleich zum Wachstum mit Glucose bestimmt werden (vgl. 4.3.1.2.1., Tab. 4.14 und 4.3.2.4., Tab. 4.23). Mitarbeiter um R. W. Bernlohr haben durch Messungen des intrazellulären Aminosäure-Pools in *B. licheniformis* gezeigt, dass

Glutamat und Alanin 60 - 90% der gesamten freien intrazellulären Aminosäuren ausmachen. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass die Produktion freier Aminosäuren der Zelle abhängig von der Zusammensetzung des Mediums und der Wachstumsphase ist (Clark et al., 1972). Eine signifikante Änderung der Expression des für die D-Alanin-Racemase kodierenden Gens *alr* (BLi00551) konnte beim Wachstum mit L-Alanin im Vergleich zum Wachstum mit Glucose für DSM13 nicht ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

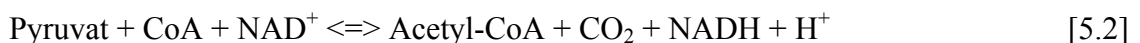
L-Asparagin und L-Aspartat

Das Enzym L-Asparaginase katalysiert die Bildung von L-Aspartat aus L-Asparagin. *E. coli* synthetisiert zwei verschiedene L-Asparaginasen (Campbell et al., 1967). Bei der Asparaginase I handelt es sich um ein zytoplasmatisches Enzym, welches von dem Gen *ansA* kodiert wird (Spring et al., 1986; McFall & Newman, 1996). Das Produkt des Gens *ansB*, die L-Asparaginase II, hingegen wird in das Periplasma sekretiert und auch nur unter anaeroben Kultivierungsbedingungen synthetisiert (Cedar & Schwartz, 1967). In *B. subtilis* ist das kodierende Gen der L-Asparaginase (*ansA*) zusammen mit dem Gen der L-Aspartase (*ansB*) in einem Operon organisiert (Sun & Setlow, 1991). Letzteres Enzym katalysiert die Umsetzung von L-Aspartat zu Fumarat. Eine Disruption des Gens *ansA* führte dazu, dass *B. subtilis* Asparagin nicht als Stickstoffquelle nutzen konnte (Sun & Setlow, 1991). Die Expression von *ansA* wird sowohl durch die Anwesenheit von Asparagin oder Aspartat, als auch durch Stickstofflimitation induziert (Sun & Setlow, 1991; Atkinson & Fisher, 1991). Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass neben *ansA* auch das Gen *ansZ* (ehemals *yccC*) für eine funktionale L-Asparaginase in *B. subtilis* kodiert (Fisher & Wray, 2002). Die Expression dieser beiden Gene wird jedoch unterschiedlich reguliert. Beim Wachstum mit Asparagin wird das *ansAB* Operon nicht mehr durch AnsR, dem Repressor des *ans*-Operons (Sun & Setlow, 1993), reprimiert und AnsA wird exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die Expression von *ansZ* während stickstofflimitierendem Wachstum durch den Stickstoff-Regulationsfaktor TnrA aktiviert (Fisher & Wray, 2002). TnrA gehört, wie auch GlnR, zur MerR-Familie der transkriptionalen Regulatoren (Fisher & Débarbouillé, 2002).

Wie für *B. subtilis* beschrieben ist auch in *B. licheniformis* DSM13 das Gen der Asparaginase (*ansA*, BLi04140) mit den Genen der Aspartase (BLi04139) und dem

Repressor AnsR (BLi04141) assoziiert (vgl. 4.3.1.2.1., Abb. 4.16). Für alle drei Gene konnte sowohl beim Wachstum mit L-Asparagin, als auch mit L-Aspartat eine signifikant erhöhte Expression ermittelt werden. Für die weiteren getesteten Aminosäuren konnte dieses nicht beobachtet werden und steht im Einklang mit den durchgeführten Experimenten zum Wachstum mit Gemischen von Aminosäuren. Nicht nur beim Wachstum mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren, sondern auch mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren konnte bei Anwesenheit von L-Asparagin im Kulturmedium eine Induktion der Gene *ansAB* und *ansR* bestimmt werden (vgl. 4.3.2.2., Tab. 4.21 und 4.3.2.4., Tab. 4.24). Eine Induktion der *yccC* Gene (BLi02777 und BLi02778), dessen Produkte ebenfalls Ähnlichkeiten zu Asparaginase aufweisen, konnte im Zusammenhang mit dem Wachstum auf L-Asparagin nicht beobachtet werden (vgl. 4.3.1.2., Tab. 4.14). Gleiches gilt für die weiteren sieben getesteten Aminosäuren. Ob die *yccC* Gene dennoch für eine funktionale L-Asparaginase in DSM13 kodieren, wurden in dieser Arbeit nicht eingehend untersucht.

Als charakteristisch im Zusammenhang mit der Verwertung von L-Asparagin konnten neben weiteren Genen auch die für die Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase kodierenden Gene ermittelt werden (vgl. 4.3.1.2.3., Abb. 4.21). Der Multienzymkomplex der Pyruvat-Dehydrogenase verbindet durch seine katalytische Aktivität die Glykolyse mit dem Tricarbonsäurezyklus. Durch drei enzymatische Reaktionen wird Pyruvat, mit NAD^+ als Co-Faktor, zu Acetyl-CoA und Kohlendioxid umgesetzt [5.2].



Kodiert werden die Komponenten des Enzymkomplexes von insgesamt vier Genen, wobei *pdhA* und *pdhB* für die α - bzw. β -Untereinheit der Komponente E1, *pdhC* für die Komponente E2 und *pdhD* für die Komponente E3 kodieren. Von den acht getesteten Aminosäuren, welche als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können, konnte nur beim Wachstum mit L-Asparagin eine erhöhte Expression dieser Gene beobachtet werden. Gleiches konnte auch beim Wachstum mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren zu einem Zeitpunkt beobachtet werden, wenn L-Asparagin noch im Kulturüberstand nachzuweisen war (vgl. 4.3.2.2., Tab. 4.20). Bestätigt wurden diese Ergebnisse für das Gen *pdhD* durch *real-time* RT-PCR. Von den sieben getesteten

proteinogenen Aminosäuren konnte nur für das Wachstum mit L-Asparagin eine erhöhte Transkription bestimmt werden (vgl. 4.3.1.3.).

Untersuchungen in *B. licheniformis* haben gezeigt, dass im Gegensatz zur Arginase (Simon & Stalon, 1976) und der Alanin-Dehydrogenase (McCowen & Phibbs, 1974) die Synthese der Asparaginase in *B. licheniformis* unter der Kontrolle der Stickstoff-Katabolitrepression steht (Schreier et al., 1982; Golden & Bernlohr, 1985). Die Arginase und Alanin-Dehydrogenase, sowie die Histidase stehen hingegen in *Bacillus* spp. unter der Kontrolle der Kohlenstoff-Katabolitrepression (Schreier et al., 1982). Dieses steht im Einklang mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen. Beim Wachstum von *B. licheniformis* DSM13 mit einem Gemisch aus sieben bzw. 20 Aminosäuren wird zunächst L-Asparagin verstoffwechselt. Ein gesteigerte Verbrauch der verbleibenden Aminosäuren ist erst zu ermitteln, wenn kein L-Asparagin mehr im Kulturüberstand zu detektieren ist (vgl. 4.3.2.1. und 4.3.2.3.). Weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit der Verwertung von Aminosäuren haben gezeigt, dass die höchste Wachstumsrate von DSM13 in einem definierten Medium mit L-Asparagin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle erzielt wird (Ochieng, 2007). Daneben zeigten die zum Wachstum in einem Gemisch von 20 Aminosäuren durchgeführten Transkriptionsanalysen, dass die Gene der Alanin-Dehydrogenase (*ald*) und der Arginase (*rocF*) in Anwesenheit von L-Asparagin im Medium reprimiert waren (vgl. 4.3.2.4., Tab. 4.23 und Tab. 4.25). Hieraus lässt sich der Schluss ziehen, dass nicht nur die Stickstoff-Katabolitrepression, sondern auch die Kohlenstoff-Katabolit-repression eine Rolle in der Verwertung von L-Asparagin spielt.

L-Glutamin und L-Glutamat

Die Umwandlung von L-Glutamin zu L-Glutamat kann durch verschiedene Enzyme erfolgen. Zum einen katalysiert die Glutaminase eine Hydrolase-Reaktion, in welcher L-Glutamin zu L-Glutamat und Ammoniak umgesetzt wird. Zum anderen katalysiert die aus zwei Untereinheiten bestehende Glutamatsynthase die Bildung von L-Glutamat. Annotiert wurden zugehörige Gene in DSM13 als *gltA* (BLi02162) und *gltB* (BLi02161). Zusammen mit der Glutaminsynthetase (*glnA*) bildet die Glutamatsynthase den sogenannten GOGAT-Zyklus, welcher der Assimilation von Ammonium unter anderem in *B. subtilis* dient (Wacker et al., 2003). Sowohl die

Glutamatsynthase, als auch die Glutaminsynthetase konnten bereits in *B. licheniformis* aufgereinigt werden (Donohue & Bernlohr, 1981; Schreier & Bernlohr, 1984).

In den Transkriptionsanalysen für DSM13 beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren konnte keine gesteigerte Expression der kodierenden Gene *glnA* und *gltAB* verzeichnet werden. Neben weiteren Aminosäuren wie L-Arginin, L-Prolin und L-Ornithin sind diese Gene beim Wachstum mit L-Glutamin reprimiert (vgl. 4.3.1.2.1., Tab. 4.14). Diese unter Referenzbedingungen beobachtete erhöhte Expression lässt sich durch die Zusammensetzung des Mediums der Referenzbedingung erklären. Die Kultivierung erfolgte hierfür in einem definierten Medium mit Glucose als Kohlenstoff- und Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle. Daraus lässt sich schließen, dass Gene, welche mit der Stickstoffassimilation im Zusammenhang stehen, unter der Referenzbedingung induziert sind. Daneben ist für *B. subtilis* eine drastisch reduzierte Expression von *gltAB* beim Wachstum Arginin, Prolin oder Ornithin beschrieben (Belitsky & Sonenshein, 2004), welches ein weiterer Grund für die in DSM13 ermittelten Expressionsdaten sein kann. Demgegenüber wurde in dieser Arbeit im Rahmen der Untersuchungen mit einzelnen Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle für das Gen *ybgJ* im Zusammenhang mit der Verwertung von Glutamin eine erhöhte Expression ermittelt. Das Produkt dieses Gens weist Ähnlichkeiten mit einer Glutaminase in DSM13 auf. Frühere Untersuchungen für *B. licheniformis* hatten gezeigt, dass die Aktivität der Glutaminase von L-Glutamin induziert wird (Cook et al., 1981). In *B. subtilis* konnte das Gen *ybgJ* ebenfalls in Verbindung mit der Nutzung von L-Glutamin gebracht werden (Satomura et al., 2005). Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptionsanalysen lässt sich schließen, dass auch in DSM13 das Gen *ybgJ* für eine Glutaminase kodiert.

L-Glutamat nimmt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel einer Zelle ein. Zum einen im Rahmen der Stickstoffassimilation und zum anderen als Donor der Aminogruppe in der Biosynthese anderer stickstoffhaltiger Komponenten (McFall & Newman, 1996). Hiermit geht die bereits erläuterte Beobachtung konform, dass Glutamat und Alanin 60-90% der gesamten freien intrazellulären Aminosäuren von *B. licheniformis* ausmachen (Clark et al., 1972). Daneben wurde Glutamat als Osmo- und Thermoprotektivum unter anderem für *B. subtilis* beschrieben (Holtmann & Bremer, 2004). Der Abbau von L-Glutamat in Enterobakterien kann über verschiedene Wege erfolgen. Zum einen besteht die Möglichkeit L-Glutamat über die Glutamat-

Dehydrogenase zu 2-Oxoglutarat umzusetzen. Die primäre Funktion dieses Enzyms scheint aber biosynthetischen Zwecken zu dienen (McFall & Newmann, 1996). Dieses konnte auch für *B. licheniformis* und *B. cereus* beobachtet werden. In zellfreien Extrakten von beiden Organismen konnte spezifische Aktivität einer NADP-abhängigen Glutamatdehydrogenase nachgewiesen werden, jedoch keine NAD-abhängige Aktivität, wie sie für eine „katabole“ Glutamatdehydrogenase zu erwarten wäre (Phibbs & Bernlohr, 1971). Ein weiterer und der bevorzugte Weg des Abbaus von L-Glutamat in *E. coli* erfolgt über Transaminierung (Marcus & Halpern, 1969). Hierbei werden zunächst L-Glutamat und Oxalacetat durch die Aspartat-Aminotransferase zu 2-Oxoglutarat und L-Aspartat umgesetzt. Letzteres kann im Weiteren, katalysiert durch die Aspartase, zu Fumarat umgewandelt werden.

Im Rahmen der durchgeführten DNA-Microarray-Analysen wurde für *B. licheniformis* DSM13 beim Wachstum mit L-Glutamat keine signifikante Änderung der Expression für das Gen der Aspartat-Aminotransferase (*aspB*) beobachtet. Die in Verbindung mit den Transkriptionsanalysen ermittelten Intensitäten der einzelnen Kanäle lassen jedoch den Schluss zu, dass das Gen der Aspartat-Aminotransferase unter beiden Kultivierungsbedingungen, d.h. sowohl beim Wachstum mit L-Glutamat, als auch mit Glucose induziert ist (Daten nicht gezeigt). Dieses wiederum ist ein Hinweis darauf, dass auch in *B. licheniformis* DSM13 das Gen *aspB* in den Abbau von Glutamat involviert ist.

L-Arginin und L-Prolin

In *B. licheniformis* sind unterschiedliche Wege zum Abbau von L-Arginin bekannt (Cunin et al., 1986). Zum einen kann L-Arginin über L-Ornithin zu Glutamat-Seminaldehyd bzw. Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat und im Weiteren zu Glutamat umgesetzt werden (Abb. 5.6).

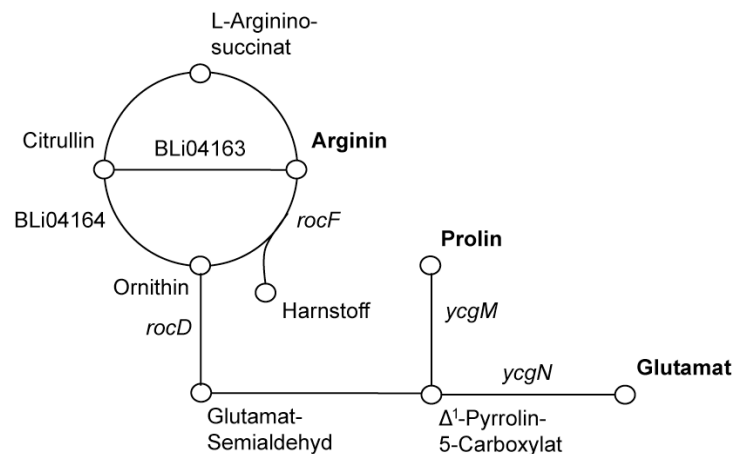


Abbildung 5.6: Darstellung des Harnstoffzyklus und beteiligter Enzyme. Die proteinogenen Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Die Zuordnung der Gene erfolgte auf Basis der mittels DNA-Microarray-Analysen ermittelten Genexpressionsverhältnissen. BLi04163, Arginin-Deiminase; BLi04164, Ornithin-Carbamoyltransferase; *rocF*, Arginase; *rocD*, Ornithin-Aminotransferase; *ycgN*, Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase; *ycgM*, Prolin-Oxidase.

Katalysiert werden die ersten beiden Reaktionen durch die Enzyme Arginase und Ornithin-Transaminase. Eine Induktion dieser beiden Enzyme kann sowohl durch Arginin, als auch Ornithin erfolgen (Laishley & Bernlohr, 1968). Es wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls beobachtet, dass Prolin nicht nur die Prolin-Oxidase, sondern auch die Arginase induziert. Arginin wiederum induziert auch die Prolin-Oxidase. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den für das Wachstum mit einzelnen Aminosäuren durchgeführten Transkriptionsanalysen dieser Arbeit. Sowohl bei der Kultivierung von DSM13 Zellen mit L-Arginin, als auch mit L-Prolin und L-Ornithin konnte eine signifikant erhöhte Expression der Gene *ycgMN* und *rocDF* im Vergleich zum Wachstum mit Glucose ermittelt werden (vgl. 4.3.1.2.1., Tab. 4.14). Hierbei kodieren *ycgMN* für ORFs, welche Ähnlichkeiten zur Prolin-Oxidase (*ycgM*) und Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (*ycgN*) zeigen und *rocDF* für eine Ornithin-Aminotransferase (*rocD*) und eine Arginase (*rocF*). Zwischen *rocD* und *rocF* ist das für eine Aminosäurepermease kodierende Gen *rocE* im Genom von DSM13 lokalisiert. *Upstream* von *rocDEF* befindet sich das Gen *rocR* (Abb. 5.7), welches für den zugehörigen transkriptionalen Aktivator kodiert.

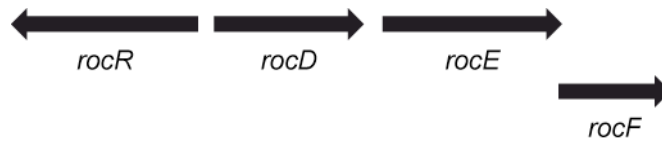


Abbildung 5.7: Genetische Anordnung, der im Zusammenhang mit der Verwertung von Arginin stehenden Gene. Im Genom von DSM13 sind die kodierenden Gene der Ornithin-Aminotransferase (*rocD*) und der Arginase (*rocF*) zusammen mit dem Genen einer Aminosäurepermease (*rocE*) und einem transkriptionalen Aktivator (*rocR*) lokalisiert.

Neben den Genen *rocABC*, *rocDEF* und *rocG* (Belitsky & Sonenshein, 1998; Calogero et al., 1994; Gardan et al., 1995) ist auch der transkriptionale Regulator RocR in der Verwertung von Arginin in *B. subtilis* involviert (Calogero et al., 1994, Ould Ali et al., 2003). Die Expression von *rocDEF* wird durch Arginin, Ornithin oder Prolin induziert und ist vom Sigmafaktor L abhängig. Eine Mutation in *rocD*, aber auch in *rocF* führt dazu, dass Arginin nicht mehr durch *B. subtilis* verwertet werden kann. Durch eine Null-Mutation in *rocR* wird das *rocDEF*-Operon nicht mehr transkribiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *rocR* nicht durch Arginin induziert wird (Gardan et al., 1995). In diesem Kontext ist es erwähnenswert, dass sich sowohl *upstream* des Promotors von *rocABC*, als auch von *rocDEF* ähnliche *inverted repeats* (UAS1 und UAS2) befinden, welche als Bindungsstellen für RocR dienen (Gardan et al., 1995). Wie bereits für das *rocDEF*-Operon beschrieben, so wird auch das putative *rocABC*-Operon durch Arginin induziert und ist Sigma L abhängig (Calogero et al., 1994). Aktivitätsmessungen haben gezeigt, dass es sich bei dem Produkt von *rocA* um eine Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase handelt. *Upstream* von *rocA* ist das Gen der katabolen Glutamat-Dehydrogenase, *rocG*, lokalisiert (Belitsky & Sonenshein, 1998 & 1999).

Wie soeben für *B. subtilis* erörtert, konnte auch anhand der Transkriptionsanalysen in *B. licheniformis* keine Induktion von *rocR* durch L-Arginin, daneben aber auch keine Induktion durch L-Prolin ermittelt werden. Reprimiert hingegen war das Gen *rocG*, nicht nur beim Wachstum mit L-Arginin, sondern auch mit L-Prolin oder L-Ornithin. In diesem Zusammenhang gilt es zu erwähnen, dass auch in DSM13 vor dem Gen *rocD* ein SigL Bindemotiv gefunden wurde (Veith, 2004). Im Unterschied zu *B. subtilis* sind in DSM13 die Gene der katabolen Glutamat-

Dehydrogenase und der Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase nicht im Genom nebeneinander lokalisiert (vgl. 4.3.1.2.1., Abb. 4.19). Ob es sich dennoch um ähnliche Regulationsmechanismen handelt müssen weitere Experimente zeigen. Mit Hinblick auf eine möglichen Rolle von σ^L in der Regulation der Verwertung von Aminosäuren, sollte kurz erläutert werden, dass die Transkription von σ^{54} abhängigen Promotoren die σ^{54} -Form der RNA-Polymerase und ein *enhancer* Protein, welches mit einer *upstream* liegenden Aktivierungssequenz (UAS) interagiert, benötigt (Fisher & Débarbouillé, 2002). Unter den in *B. subtilis* beschriebenen σ^L abhängigen Aktivatoren sind neben LevR (Débarbouillé et al., 1991), RocR (Calogero et al., 1994), AcoR (Huang et al., 1999, Ould Ali et al., 2003), auch BkdR (Débarbouillé et al., 1999) zu finden. Im Gegensatz zu dem transkriptionalen Aktivatorprotein NtrC der Enterobakterien vermitteln die SigL transkriptionalen Aktivatoren von *B. subtilis* eine Substrat-abhängige Induktion (Fisher & Débarbouillé, 2002). Eine Sigma L-defizite Mutante in *B. subtilis* kann weder Arginin, noch Ornithin verwerten (Calogero et al., 1994).

Der eben geschilderte Abbauweg des L-Arginins über die Arginase wird unter aeroben Wachstumsbedingungen von *B. licheniformis* bevorzugt. Der zweite für diesen Organismus beschriebene Weg der Verwertung von L-Arginin erfolgt über die Arginin-Deiminase (Broman et al., 1978). Dieses Enzym setzt zunächst L-Arginin zu L-Citrullin um, welches anschließend, katalysiert durch die Ornithin-Carbamoyltransferase, zu L-Ornithin und Carbamoylphosphat umgewandelt wird. In einem letzten durch die Carbamat-Kinase katalysierten Schritt kann die Phosphat-Gruppe des Carbamoylphosphats ein ADP zu ATP phosphorylieren. Eine Induktion dieses Abbauweges erfolgt unter anaeroben Kultivierungsbedingungen in Anwesenheit von Arginin. Die Klonierung und Sequenzierung der zugehörigen Gene ergab, dass diese in einer operonähnlichen Struktur in *B. licheniformis* vorliegen (Maghnouj et al., 1998). Dieses konnte während der Analysen des Genoms von *B. licheniformis* bestätigt werden. Anders als die veröffentlichten ORF-Bezeichnungen des Göttinger Genomlabors (BLi04162 bis BLi04166) sind bei der von Novozymes Biotech Inc parallel durchgeführten Sequenzierung von DSM13 die von Maghnouj et al. beschriebenen Genbezeichnungen zu finden (Abb. 5.8).

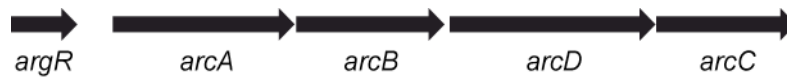


Abbildung 5.8: Genregion der Arginin-Deiminase in *B. licheniformis*. Erläuterungen der Genprodukte nach Maghnouj et al. (1998). *argR* (BLi04162) - Arginin-Repressor, *arcA* (BLi04163) - Arginin-Deiminase, *arcB* (BLi04164) - Ornithin-Carbamoyltransferase, *arcD* (BLi04165) - putativer Arginin-Ornithin-Antiporter, *arcC* (BLi04166) - Carbamat-Kinase

Im Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Wachstum auf einzelnen Aminosäuren als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle konnte, wie zu vermuten war, keine erhöhte Expression für die ORFs der Arginin-Deiminase (*arcA*, BLi04163) und der Ornithin-Carbamoyltransferase (*arcB*, BLi04164) beim Wachstum mit L-Arginin ermittelt werden (vgl. 4.3.1.2.1., Tab. 4.14). In diesem Kontext zeigte auch das Gen des putativen Arginin-Ornithin-Antiporters (*arcD*, BLi04165) keine signifikante Änderung des Expressionsverhältnisses (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren konnten weder für das kodierende Gen des Arginin-Repressors (*argR*, BLi04162), noch für das Gen der Carbamat-Kinase (*arcC*, BLi04166) Expressionsdaten ermittelt werden. Im Gegensatz hierzu konnten bei der Kultivierung von DSM13 Zellen mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren für diese Gene zu verschiedenen Zeitpunkten Änderungen der Genexpression ermittelt werden. Der ORF der Arginin-Deiminase war zu allen fünf gewählten Zeitpunkten induziert. Eine signifikant erhöhte Expression für die ORFs des putativen Arginin-Ornithin-Antiporters und der Carbamat-Kinase konnte für die Zeitpunkte T2 und T3 und im Fall der Ornithin-Carbamoyltransferase sogar zusätzlich zum Zeitpunkt T5 ermittelt werden. Für den ORF des Arginin-Repressors konnte für die Zeitpunkte T2 bis T5 eine erhöhte Expression verzeichnet werden (vgl. 4.3.2.4., Tab. 4.25). DNase I *footprinting* Daten haben gezeigt, dass das gereinigte Protein des Repressors ArgR an eine Sequenz *upstream* vom *arcA* Promoter bindet (Maghnouj et al., 1998). Unter Sauerstoffausschluss und in Gegenwart von Arginin können *argR* Mutanten den Abbauweg über die Arginin-Deiminase nicht induzieren. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es sich bei ArgR um den Aktivator dieses Abbauweges handelt (Maghnouj et al., 1998). Der Grund, weshalb unter den in dieser Arbeit gewählten

Versuchsbedingungen die Gene des Abbauweges über die Arginin-Deiminase induziert waren, konnte bisher nicht geklärt werden.

Anders als für *B. subtilis* beschrieben (Cruz-Ramos et al., 1997), konnte im Rahmen des Genomprojektes für *B. licheniformis* DSM13 keines der strukturellen Gene der Urease (*ureABC*; Mobley et al., 1995) identifiziert werden. Die Urease katalysiert die Umsetzung von Harnstoff zu Ammoniak und Carbamat. Letzteres wird spontan zu einem weitem Molekül Ammoniak und Kohlensäure abgebaut. Gebildet wird Harnstoff unter anderem in der durch die Arginase katalysierten Abbaureaktion von Arginin zu Ornithin. Zur experimentellen Überprüfung wurde DSM13 in einem definierten Medium mit Harnstoff als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle kultiviert. Um zu ermitteln, ob DSM13 Harnstoff als Stickstoffquelle nutzen kann, wurde *B. licheniformis* in einem definierten Medium mit Glucose bzw. Xylose kultiviert. Wie zu erwarten, konnte Harnstoff weder als Stickstoff-, noch als Kohlenstoffquelle von DSM13 genutzt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses geht mit der Beobachtung konform, dass sowohl beim Wachstum mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren, als auch mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren eine Akkumulation von Harnstoff im Kulturüberstand zu detektieren war (vgl. 4.3.2.1. und 4.3.2.3.).

Der Abbau von L-Prolin erfolgt über zwei enzymatische Schritte. Zunächst wird L-Prolin zu Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat und im Anschluss daran zu L-Glutamat umgesetzt. In DSM13 wurden zwei Gene identifiziert, welche an diesen Schritten beteiligt sind. Das Produkt von *ycgM* weist Ähnlichkeiten zu einer Prolin-Oxidase auf und das von *ycgN* zu einer Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase. Im Genom von DSM13 sind diese nebeneinander lokalisiert. In *S. typhimurium* werden die beiden enzymatischen Aktivitäten von einem einzelnen Gen, *putA*, kodiert (Ratzkin & Roth, 1978). Die Aufnahme von L-Prolin in *E. coli* und *S. typhimurium* erfolgt hauptsächlich über eine induzierbare L-Prolin-Permease. Das kodierende Gen, *putP*, ist angrenzend zu *putA* lokalisiert (McFall & Newman, 1996; Wood, 1981). Auch in DSM13 ist *downstream* von *ycgMN* ein Gen *ycgO* lokalisiert, dessen Produkt Ähnlichkeit mit einer Prolin-Permease aufweist. Beim Wachstum mit den proteinogenen Aminosäuren L-Arginin bzw. L-Prolin wurde neben *ycgMN* auch für *ycgO* eine erhöhte Expression ermittelt. Gleiches konnte auch beim Wachstum mit L-Ornithin beobachtet werden (Tab. 7.4 im Anhang). Die Transkriptionsanalysen beim Wachstum in einem definierten Medium mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren lassen eine Induktion für *ycgO* in

Abhängigkeit von L-Prolin vermuten. Eine erhöhte Expression dieses Gens konnte nicht mehr ermittelt werden, wenn nur noch geringe Mengen von L-Prolin im Kulturüberstand zu detektieren waren (vgl. 4.3.2.4.)

Neben der Verwertung von L-Prolin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle kann dieses auch als Osmoprotektant dienen (Wood, 1988). Der Transport von Prolin als osmoprotektive Substanz erfolgt in *B. subtilis* durch das OpuE-Transportsystem (von Blohn et al., 1997). Beim Wachstum von DSM13 mit den drei oben genannten Aminosäuren war der kodierende ORF BLi00728 im Vergleich zum Wachstum mit Glucose reprimiert (Daten nicht gezeigt). Wie bereits erläutert, laufen die Abbauwege von L-Arginin und L-Prolin zusammen und haben den gemeinsamen Intermediaten Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat. Untersuchungen zur Regulation der Verwertung von Arginin und Prolin lassen den Schluss zu, dass dieser Intermediat beide Abbauwege induziert (Laishley & Bernlohr, 1968). Basierend auf den durchgeführten Transkriptionsanalysen, unter Berücksichtigung der Analysen der Kulturüberstände, konnte in dieser Arbeit auch für DSM13 eine Beteiligung der Gene *ycgMNO* am Abbau von L-Prolin und im weiteren auch von L-Arginin und L-Ornithin beobachtet werden.

Siderophore

Bei der Kultivierung von *B. licheniformis* DSM13 in einem definierten Medium wurde mit zunehmender Kulturdichte eine rotbraune Färbung des Mediums beobachtet. In vorangegangenen Untersuchungen wurde dieses bereits in Verbindung mit der Biosynthese von Siderophoren gebracht (Veith, 2004). Siderophore sind Chelatkomplexe, welche mit hoher Affinität unlösliches Eisen komplexieren und anschließend über spezielle Aufnahmesysteme in die Zelle transportieren. Eisen ist eine essentielle Komponente von Cytochromen und Eisen-Schwefel-Proteinen, die in den Elektronentransport involviert sind. Unter Eisenmangelbedingungen bildet *B. subtilis* das Siderophor Bacillibactin (May et al., 2001). Die Expression von Eisen-Aufnahmesystemen wird in *B. subtilis* durch das Enzym FUR (*ferric uptake repressor*) in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von intrazellularem Eisen reguliert (Baichoo & Helmann, 2002). In die Aufnahme des Eisen-Bacillibactin-Komplexes ist der FeuABC-Transporter involviert. Die Freisetzung des Eisens in die Zelle wird durch das Protein BesA (ehemals YuiI), einer Trilacton-Hydrolase, vermittelt (Miethke et al., 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Induktion des Eisen-

Bacillibactin-Aufnahmesystems durch YbbB erfolgt (Gaballa & Helmann, 2007). In *B. subtilis* sind die an der Bildung des Siderophores Bacillibactin beteiligten Gene (*dhbACEBF*) getrennt von den Genen organisiert, welche an der Aufnahme des Eisen-Bacillibactin-Komplexes bzw. der anschließenden Freisetzung des Eisens in die Zelle beteiligt sind (Abb. 7.2 im Anhang).

Orthologe Gene, welche Homologien zu der an Biosynthese, Aufnahme und Freisetzung von Bacillibactin bzw. des Eisens beteiligten Gene zeigen, sind auch in *B. licheniformis* vorhanden. Im Gegensatz zu *B. subtilis* sind diese Gene in DSM13 zusammen organisiert (Abb. 7.3 im Anhang). Bei der Kultivierung von DSM13 in einem definierten Medium mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren konnte für diese Gene eine Änderung der Expressionsverhältnisse verzeichnet werden (vgl. 4.3.2.4., Tab. 4.27). Zu den Zeitpunkten T2, T4 und T5 waren die Gene *dhbACEBF* bei auf Aminosäuren gewachsenen Zellen induziert. Eine erhöhte Expression unter diesen Kultivierungsbedingungen konnte hingegen zu allen fünf Zeitpunkten für die Gene *feuABC* und *yuiI* ermittelt werden. Die Zeitpunkte T4 und T5 gehen mit der gesteigerten rotbraunen Färbung des Mediums konform. Die Thematik, weshalb die Gene *dhbACEBF* zum Zeitpunkt T2 induziert waren und zum Zeitpunkt T3 wiederum nicht, wurde in dieser Arbeit nicht näher beleuchtet.

Bacteriophagen

Im Rahmen der Genomsequenzierung von DSM13 wurden vier Prophagen identifiziert. Drei der vier Prophagen sind dabei in Bereichen des Genoms lokalisiert, welche geringe bis keine Homologien zu ORFs aus *B. subtilis* aufweisen. Des Weiteren waren für diese Bereiche deutliche Abweichungen des lokalen G+C Gehaltes zu vermerken. Ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt im Uhrzeigersinn sind dieses der zweite, dritte und vierte Prophage im Genom von DSM13. Im Bereich des ersten Phagen hingegen konnten Gene identifiziert werden, welche hohe Homologien mit Genen des PBSX Prophagen von *B. subtilis* aufweisen. Ergänzend kann noch angeführt werden, dass dieser Bereich, anders als die der weiteren drei Prophagen, keine Auffälligkeiten bezüglich der *codon usage* im Vergleich zur *codon usage* des Genoms von DSM13 aufwies (Veith, 2004). Im Zusammenhang mit dem Wachstum von DSM13 mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren konnte in den hierzu durchgeführten Transkriptionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten eine Induktion von Genen der

Prophagenbereiche verzeichnet werden (vgl. Tab. 7.8 im Anhang). Es konnten für einen Großteil der ORFs, welche dem PBSX Phagenbereich zugeordnet wurden, reproduzierbar zum Zeitpunkt T3 eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Aminosäuren ermittelt werden. Daneben konnte für eine Anzahl der ORFs des zweiten Phagenbereiches zwischen den Zeitpunkten T1 und T4 eine erhöhte Expression verzeichnet werden. Für phagenassoziierte ORFs, welche im dritten bzw. vierten Bereich lokalisiert sind, wurden im Gegensatz dazu keine gesteigerten Änderungen der Expressionsverhältnisse beobachtet bzw. keine ermittelt. Ob und welche Auswirkungen eine mögliche Induktion der beiden Prophagen auf die Verwertung von Aminosäuren hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehend untersucht. Es ist jedoch interessant, dass in *B. licheniformis* NRS 243 durch Mitomycin C induzierbare Bacteriophagen charakterisiert wurden (Huang & Marmur, 1970). In dem Zusammenhang wurden zwei morphologisch unterschiedliche Phagen gefunden, wobei der erste Phage Ähnlichkeiten zum PBSX Phagen aus *B. subtilis* zeigte. Der zweite hatte hingegen morphologische Ähnlichkeit zum temperenten Phagen $\phi 105$ aus *B. subtilis*. Daneben konnte auch in *B. licheniformis* DSM13 ein Phage mittels Mitomycin C induziert werden (Rachinger, 2010). Um welchen Bacteriophagen es sich handelt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Eine Deletion des Bereiches, welcher Homologien zum PBSX Phagen aus *B. subtilis* aufwies, führte jedoch dazu, dass sich in der Mutante kein Phage durch Mitomycin C induzieren ließ.

Gemeinsam exprimierte Gene beim Wachstum mit Aminosäuren

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Transkriptionsanalyse eine Gruppe von Genen identifiziert werden, welche offensichtlich konstitutiv beim Wachstum von *B. licheniformis* mit Aminosäuren induziert waren (vgl. 4.3.1.2.2.). Neben *acoR*, konnte außerdem für die Genregion BLi02106 bis BLi02102 und der ORF BLi04275 eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Aminosäuren im Vergleich zur Kultivierung mit Glucose verzeichnet werden. Ebenfalls unter diesen Versuchsbedingungen induziert waren die ORFs BLi01143 und BLi03498. Sowohl für *acoR*, als auch für den ORF BLi02104 (*mmsA*) wurde diese erhöhte Genexpression für das Wachstum mit proteinogenen Aminosäuren mittels *real-time* RT-PCR verifiziert (vgl. 4.3.1.3.). Lediglich im Zusammenhang mit dem Wachstum auf L-Asparagin konnte das Resultat der DNA-Microarray-Analysen für *acoR* nicht bestätigt werden. Dieses Gen kodiert für

den transkriptionalen Regulator des Acetoin-Dehydrogenase Operons. Wie bereits erläutert, wurde dieser in *B. subtilis* als σ^L abhängiger Aktivator beschrieben (Huang et al., 1999; Ould Ali et al., 2003). Eine erhöhte Expression der Gene des Acetoin-Dehydrogenase-Operons wurde beim Wachstum mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren zu den Zeitpunkten T4 und T5, also beim Übergang in die stationäre Phase verzeichnet. Eine Akkumulation von Acetoin im Kulturüberstand wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht detektiert (Daten nicht gezeigt). Der ORF BLi01143 (*mela*) kodiert für eine α -D-Galaktosid-Galaktohydrolase und ist augenscheinlich mit der Verwertung von Zuckern, genauer dem Disaccharid Melibiose, assoziiert. Eine Induktion von MelA konnte in *B. subtilis* während der Adaption an anaerobe Wachstumsbedingungen beobachtet werden (Marino et al., 2000). Im Genom von DSM13 ist *mela* in direkter Nachbarschaft zu Genen (*amyCD*) lokalisiert, welche in den Transport von Zuckern involviert sind. Ergänzend muss noch hinzugefügt werden, dass eine signifikant erhöhte Expression der ORFs BLi01143 und BLi03498 beim Wachstum mit L-Ornithin als einzige C- und N-Quelle nicht verzeichnet werden konnte. Hingegen waren *acoR*, die ORFs BLi02106 bis BLi02102 und BLi04275 auch bei der Kultivierung mit dieser nicht-proteinogenen Aminosäure induziert (Tab. 7.9 im Anhang).

Unter Verwendung des bioinformatischen Softwaretools *BiBag* (vgl. 4.4.) konnte gezeigt werden, dass die weiteren der gemeinsam exprimierten Gene *unique* für *B. licheniformis* DSM13 im Vergleich zu *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 sind. D. h. es konnten keine Orthologe in diesen beiden Organismen identifiziert werden. Der ORF BLi03498 kodiert für eine putative Pectin-Methylesterase. Pectine sind pflanzliche Polysaccharide und daher ist auch dieser ORF augenscheinlich in die Verwertung von Zuckern involviert. Ein Ortholog konnte jedoch auch nicht in *B. weihenstephanensis* KBAB4 und *B. cereus* ATCC14579 identifiziert werden (vgl. 4.4., Tab. 4.30). Lokalisiert ist dieser ORF in DSM13 in Nachbarschaft zu sogenannten Y-ORFs. Dieses sind allgemein gesprochen Gene, deren Produkte bisher nicht näher charakterisiert wurden bzw. kaum Homologien mit anderen Genen aufweisen. Der ORF BLi04275 kodiert für ein Homolog der L-Alanin-Dehydrogenase. Im Gegensatz zu den weiteren charakteristischen Genen für DSM13 konnte für dieses Gen keine erhöhte Expression beim Wachstum mit Acetat, wie auch mit 2,3-Butandiol ermittelt werden (vgl. 4.4., Tab. 4.29). Daneben konnte im Rahmen der Untersuchungen des

extrazellulärem Proteoms von DSM13 das Produkt des ORFs BLi04275 beim Wachstum mit dem komplexen LB-Medium identifiziert werden, nicht jedoch unter Glucose-, Phosphat- und Stickstoffmangelbedingungen (Voigt et al., 2006). L-Alanin löst in vielen Bacillen die Keimung von Sporen aus (Powell & Hunter, 1955). Untersuchungen in *B. subtilis* haben die Anwesenheit von zwei Arten von L-Aminosäure-Dehydrogenasen in ruhenden Sporen gezeigt. Im Gegensatz zu ersteren, welche spezifisch für L-Alanin war, handelt es sich bei der zweiten um eine nicht-spezifische Dehydrogenase, welche neben L-Alanin auch die verzweigtkettigen Aminosäuren L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin als Substrate nutzt (Nitta et al., 1974). Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Funktion des ORFs BLi04275 in DSM13 sein.

Der ORF BLi02104 ist in der bereits angesprochenen Genregion BLi02106 bis BLi02102 lokalisiert und kodiert für eine Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase. DSM13 besitzt zwei paraloge Gene, welche für eine Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodieren, wobei der zweite ORF, BLi04251, im Genom von DSM13 mit Genen assoziiert ist, welche Homologien zu Genen des Myo-Inositol-Abbaus in *B. subtilis* aufweisen (Stines-Chaumeil et al., 2006; Yoshida et al., 2008). Sowohl der *upstream*, als auch *downstream* gelegene ORF der Genregion BLi02106 bis BLi02102 zeigte keine signifikant erhöhte Expression beim Wachstum von DSM13 mit einzelnen Aminosäuren als C- und N-Quelle (Daten nicht gezeigt). Basierend auf Transkriptionsanalysen lässt dies eine operonähnliche Struktur dieser Genregion vermuten. Die ORFs BLi02102 und BLi02103 kodieren für putative Enoyl-CoA-Hydratasen. Ergänzend gilt es noch zu erwähnen, dass für den ORF BLi02103 kein Ortholog, sowohl in *B. weihenstephanensis* KBAB4, als auch in *B. cereus* ATCC14579 identifiziert werden konnte (vgl. 4.4., Tab. 4.30). Enoyl-CoA-Hydratasen sind in *E. coli* mit dem Multienzymkomplex der Fettsäureoxidation assoziiert (Pawar & Schulz., 1981; Pramanik et al., 1979). Wie bereits erläutert, kodiert der ORF BLi02104 für eine Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert in *B. subtilis* die NAD-abhängige Oxidation von Methylmalonat-Semialdehyd und Malonat-Semialdehyd zu Propionyl-CoA und Acetyl-CoA (Stines-Chaumeil et al., 2006). Letztere wiederum stellen die Vorläufer des Methylcitrat- bzw. Tricarbonsäurezyklus dar. Der ORF BLi02105 kodiert für eine putative 2-Hydroxy-3-Oxopropionat-Reduktase. Ein weiterer Name dieses Enzyms lautet Tartronat-Semialdehyd-Reduktase

und ist in den Metabolismus von C2-Komponenten involviert (Gotto & Kornberg, 1961). Der ORF BLi02106 dieses putativen Operons kodiert für eine putative Butyryl-CoA-Dehydrogenase. Hierbei handelt es sich um eine Oxidoreduktase, welche zur Familie der Acyl-CoA-Dehydrogenasen gehört. Letztere wiederum sind mit dem bereits erwähnten Multienzymkomplex der Fettsäureoxidation assoziiert (Pramanik et al., 1979). Die genaue Rolle und Funktion dieses putativen Operons im Aminosäure- bzw. C2-Metabolismus muss in weiteren Untersuchungen noch näher beleuchtet werden.

Tricarbonsäurezyklus

Beim Wachstum mit Aminosäuren wie Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Arginin, Prolin oder Ornithin als einzige Kohlenstoffquelle werden diese Substrate zu Oxalacetat umgesetzt. Durch die PEP-Carboxykinase kann unter Verbrauch von ATP aus Oxalacetat Phosphoenolpyruvat (PEP), der Vorläufer der Gluconeogenese, synthetisiert werden (vgl. 5.2; Sonenshein, 2002). In *E. coli* sind verschiedene Wege, ausgehend von C4-Dicarbonsäuren, für die Bildung von PEP bekannt (Hansen & Juni, 1974, 1975). Zum einen kann Malat durch die Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert und anschließend, wie eben erläutert, zu PEP umgesetzt werden. Daneben kann Malat, katalysiert durch ein Malat-Enzym, oxidativ zu Pyruvat decarboxyliert und im weiteren durch die PEP-Synthetase zu Phosphoenolpyruvat umgewandelt werden. Auch in *B. subtilis* konnte die Aktivität des Malat-Enzyms gezeigt werden (Diesterhaft & Freese, 1973). Weiterführende Untersuchungen in *B. subtilis* lassen vermuten, dass neben anderen Enzymen des Tricarbonsäurezyklus sowohl die Pyruvat-Dehydrogenase, als auch das Malat-Enzym durch Substratinduktion reguliert wird. Wie bereits unter 5.2. erläutert, unterliegen die ersten drei Enzyme des TCA-Zyklus der sogenannten *feedback* Repression (Ohné, 1975), wobei die Aconitat-Hydratase durch die Citrat vermittelte Induktion eine Sonderstellung einnimmt.

Wie unter 4.3.1.2.3. bzw. 4.3.1.2.4. beschrieben, konnte beim Wachstum von DSM13 mit L-Asparagin als alleinige C- und N-Quelle eine erhöhte Expression der Gene des Multienzymkomplexes der Pyruvat-Dehydrogenase (*pdhABCD*) und eines möglichen Malo-Lactat-Enzyms (*mleA*) ermittelt werden. Enzymatische Untersuchungen in *B. subtilis* haben gezeigt, dass es sich bei MleA nicht um ein Malo-Lactat-Enzym handelt (Lerondel et al., 2006). In dem Kontext konnte diesem Enzym jedoch keine eindeutige physiologische Bedeutung zugeordnet werden, da lediglich in

der exponentialen Wachstumsphase in einem komplexen Medium eine erhöhte Transkription von *mleA* beobachtet wurde. Dieses geht mit den in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen zum Wachstum mit Gemischen von Aminosäuren konform (vgl. 4.3.2.2., Tab. 4.21 und 4.3.2.4., Tab. 4.24). Im Gegensatz zu den Untersuchungen in *B. subtilis* konnte in der vorliegenden Arbeit für *B. licheniformis* DSM13 eine Induktion dieses Gens in Verbindung mit L-Asparagin gebracht werden. Sowohl beim Wachstum in einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren, als auch mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren wurde eine erhöhte Expression für *mleA* zu Zeitpunkten ermittelt, in welchen L-Asparagin im Kulturüberstand nachzuweisen war. Gleiches gilt für das in direkter Nachbarschaft im Genom von DSM13 lokalisierte Gen *mleN*. Dessen Produkt wurde als Malat-H⁺/Na⁺-Lactat Antiporter annotiert. Zu Zeitpunkten in denen kein L-Asparagin mehr detektiert wurde, konnte unter beiden Kultivierungsbedingungen auch keine erhöhte Expression dieser Gene verzeichnet werden. Wie bereits unter 4.3.1.2.1. erläutert, sind *upstream* dieser beiden ORFs die Gene des *ansAB* Operons lokalisiert und kodieren für eine Asparaginase (*ansA*, BLi04140) bzw. Aspartase (*ansB*, BLi04140). Sowohl für diese Gene, als auch für das *upstream* gelegene *ansR*, welches für den transkriptionellen Repressor des *ansAB* Operons kodiert, konnte das gleiche Expressionsmuster beobachtet werden. Neben diesen Genen konnte auch eine Induktion des für die PEP-Carboxykinase kodierenden Gens *pckA* für DSM13 ermittelt werden. Im Gegensatz zu den zuvor erläuterten Genen wurde nicht nur in Verbindung mit L-Asparagin (Tab. 7.11 im Anhang), sondern auch beim Wachstum mit allen getesteten Aminosäuren bzw. zu allen Zeitpunkten beim Wachstum mit Gemischen von Aminosäuren eine erhöhte Expression verzeichnet (Daten nicht gezeigt).

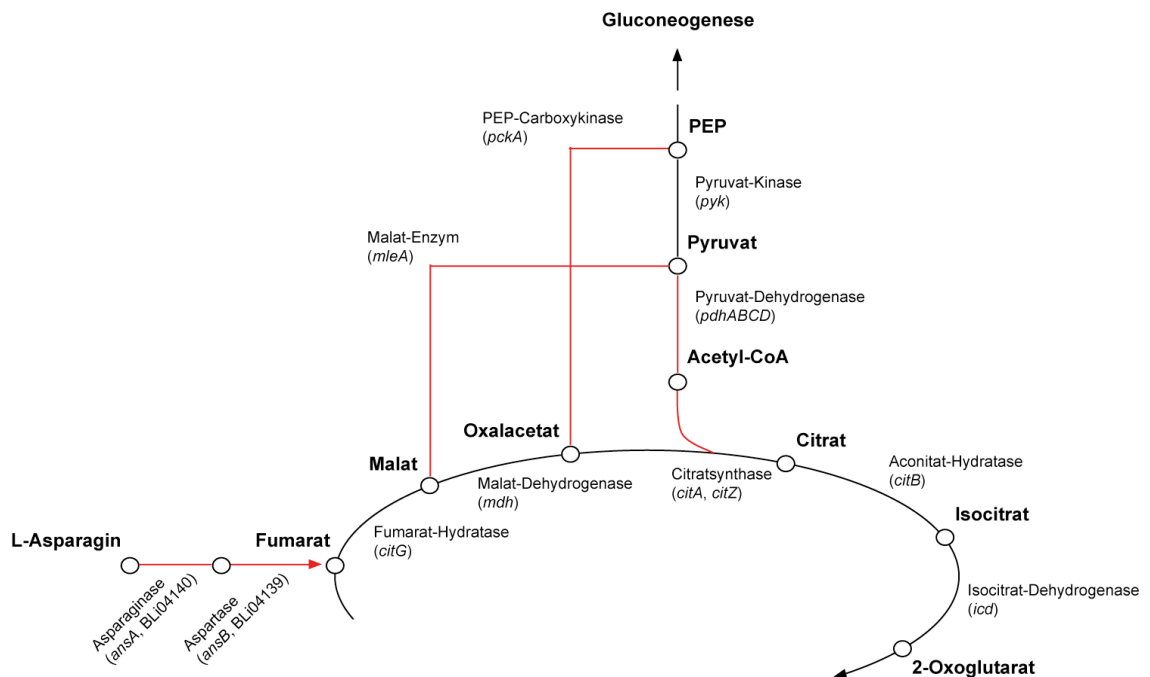


Abbildung 5.9: Schematische Übersicht des Einmündens von Asparagin in den Tricarbonsäurezyklus (adaptiert nach Lerondel et al., 2006). Basierend auf Transkriptionsanalysen sind in rot mögliche enzymatische Umsetzungen dargestellt.

Die in diesem Kontext ermittelten Expressionsverhältnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Asparagin zunächst, katalysiert durch die Enzyme AnsA und AnsB, zu Fumarat umgesetzt wird. Letzteres kann wiederum über Malat zu Oxalacetat und im Anschluss daran weiter, katalysiert durch die PEP-Carboxykinase, zu Phosphoenolpyruvat umgesetzt werden und somit der Gluconeogenese dienen. Daneben könnte das Gen *mleA* eine analoge Rolle des Malat-Enzyms, wie es eingangs für *E. coli* beschrieben wurde, einnehmen und Malat zu Pyruvat umsetzen. Dieses kann im Weiteren, neben anderen biosynthetischen Zwecken, zu Acetyl-CoA umgesetzt und in den TCA-Zyklus eingeschleust werden (Abb. 5.9). Diese Vermutung steht im Einklang mit der bereits beschriebenen gesteigerten Expression der Gene des Multienzymkomplexes der Pyruvat-Dehydrogenase beim Wachstum von DSM13 mit L-Asparagin. Ergänzend soll in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass Phosphoenolpyruvat in *E. coli* aktivierend auf die Pyruvat-Dehydrogenase wirkt. Ein weiteren Hinweis auf eine gesteigerte Aktivität der Enzyme des TCA-Zyklus lässt die im Zusammenhang mit L-Asparagin ermittelte erhöhte Expression des für die

Citratsynthase I kodierenden Gens *citA* vermuten. Diese auf Transkriptionsanalysen basierende Hypothese muss jedoch noch durch weiterführende molekularbiologische und biochemische Experimente überprüft werden.

Citratsynthasen

Citratsynthasen katalysieren die Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat und stellen somit das erste Enzym des Tricarbonsäurezyklus dar. Generell betrachtet werden die Citratsynthasen in Gram-positiven Bakterien durch ATP und im Gegensatz dazu in Gram-negativen Bakterien durch NADH inhibiert (Jin & Sonenshein, 1994a). Während der Genomsequenzierung von DSM13 konnten drei Citratsynthasen identifiziert werden. Hierbei ist anzumerken, dass es sich bei der Citratsynthase III vermutlich um eine Methylcitratsynthase handelt. Wie für *B. subtilis* beschrieben ist auch in DSM13 das für die Citratsynthase I kodierende Gen *citA* mit *citR* im Genom assoziiert. Hierbei kodiert *citR* für den transkriptionalen Repressor von *citA*. Das Gen der Citratsynthase II, *citZ*, ist in beiden Organismen in direkter Nachbarschaft zu den Genen der Isocitrat-Dehydrogenase (*icd*) und der Malat-Dehydrogenase (*mdh*) lokalisiert. Eine Mutation in *citA* hat nur einen geringen Effekt auf das Wachstum und die Citratsynthase-Aktivität in *B. subtilis* (Jin & Sonenshein, 1994a; Jin & Sonenshein, 1996). Als Folge einer Mutation von *citZ* wurde im Gegensatz dazu ein erheblicher Verlust der Citratsynthase-Aktivität, Glutamat-Auxotrophie und ein Defekt in der Sporulation beschrieben (Jin & Sonenshein, 1994a). Zusammen mit vergleichenden Messungen der mRNA Level von *citA* und *citZ* wurde daraus geschlossen, dass *citZ* für die eigentliche Citratsynthase in *B. subtilis* kodiert (Jin & Sonenshein, 1994b; Jin & Sonenshein, 1996).

Ähnliches konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für eine Mutation in *citA* beobachtet werden. Transkriptionsanalysen haben gezeigt, dass *citA* beim Wachstum mit L-Asparagin bzw. L-Aspartat als einzige C- und N-Quelle induziert war (vgl. 4.3.1.2.4., Abb. 4.22). In diesem Kontext konnte für die verbliebenen fünf proteinogenen Aminosäuren eine erhöhte Expression des für die (Methyl-) Citratsynthase III kodierenden Gens *mmgD* ermittelt werden. Im Weiteren konnte diese erhöhte Expression von *citA* im Zusammenhang mit L-Asparagin ebenfalls beim Wachstum mit Gemischen von Aminosäuren beobachtet werden (vgl. 4.3.2.2., Abb. 4.26 und 4.3.2.4., Abb. 4.30). Wurde L-Asparagin noch im Kulturüberstand detektiert,

war zu diesen Zeitpunkten *citA* induziert. Für die weiteren Zeitpunkte beim Wachstum mit einem Gemisch aus 20 Aminosäuren konnte eine erhöhte Expression für *mngD* ermittelt werden. Für den Zeitpunkt T3 bei der Kultivierung mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren wurde lediglich beobachtet, dass *citA* nicht mehr induziert war. Im Gegensatz zu den soeben geschilderten Beobachtungen konnte für das Gen der Citratsynthase II, *citZ*, unter keiner der gewählten Versuchsbedingungen eine signifikante Steigerung der Expression beim Wachstum mit Aminosäuren im Vergleich zum Wachstum mit Glucose ermittelt werden.

Aufgrund der ermittelten Genexpressionsdaten für die Citratsynthasen wäre ein schlechteres Wachstum einer *citA*-Mutante im Zusammenhang mit L-Asparagin zu vermuten. Dieses konnte jedoch anhand der bisher durchgeführten Kultivierungsexperimente und Analysen der Kulturüberstände nicht beobachtet werden (vgl. 4.6.). In einem definierten Medium mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren wurde kein Wachstumsunterschied von $\Delta citA$ im Vergleich zum Wildtyp DSM13 oder dessen Derivat MW3 beobachtet. Auch die Analysen der Kulturüberstände lieferten keine weiteren Erkenntnisse. Wie der Wildtyp, so verwertete auch die *citA*-Mutante zunächst L-Asparagin und erst im Anschluss daran war ein gesteigerter Verbrauch der verbliebenen proteinogenen Aminosäuren zu beobachten. Des Weiteren konnte auch anhand der durchgeführten Plattentests zum Wachstum in einem definierten Medium mit Glucose kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden.

Diese bisher im Rahmen zur phänotypischen Charakterisierung durchgeführten Experimente lassen auf eine ähnliche Funktion von *citA* in DSM13 schließen, wie sie für *B. subtilis* beschrieben wurde. Einen weiteren Hinweis auf diese Vermutung liefern die durchgeführten Transkriptionsanalysen. Auch wenn mithilfe dieser keine signifikante Änderung des Expressionsverhältnisses für das Gen der Citratsynthase II (*citZ*) in DSM13 ermittelt werden konnte, so lassen die starken Intensitäten der einzelnen Kanäle jedoch den Schluss zu, dass dieses Gen sowohl beim Wachstum mit einzelnen Aminosäuren, als auch unter Kultivierungsbedingungen mit Glucose induziert ist (Daten nicht gezeigt). Ergänzend soll noch hinzugefügt werden, dass eine Mutation von *citA* in *B. subtilis* keinen Effekt auf die Transkription von *citZ* hat und umgekehrt (Jin & Sonenshein, 1994b).

Methylcitratzyklus

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert konnte im Rahmen der Transkriptionsanalysen eine erhöhte Expression des Gens der putativen (Methyl-) Citratsynthase III (*mmgD*) im Zusammenhang mit den proteinogenen Aminosäuren L-Alanin, L-Arginin, L-Glutamin, L-Glutamat und L-Prolin beobachtet werden. Das kodierende Gen dieser (Methyl-) Citratsynthase III ist im Genom von *B. licheniformis* DSM13 mit weiteren Genen eines putativen Methylcitratzyklus assoziiert.

Besonders gut ist der Methylcitratzyklus in *S. typhimurium* LT2 untersucht. Die notwendigen Gene für den Abbau von Propionat in diesem Organismus sind in zwei transkriptionalen Einheiten organisiert, *prpR* und *prpBCDE*. Die Gene *prpBCDE* sind in einem Operon organisiert und kodieren für die 2-Methylisocitrat-Lyase (*prpB*), die 2-Methylcitratsynthase (*prpC*), die 2-Methylcitrat-Dehydratase (*prpD*) und die Propionyl-CoA-Synthetase (*prpE*) (Horswill & Escalante-Semerena, 1997). Im Gegensatz zu den anderen Produkten dieses Operons ist PrpE nicht für das Wachstum mit Propionat in *S. typhimurium* LT2 notwendig (Horswill & Escalante-Semerena, 1999a, 1999b). Das Gen *prpR* kodiert für einen σ^{54} abhängigen transkriptionalen Aktivator, welcher für die Transkription des *prpBCDE*-Operons notwendig ist (Palacios & Escalante-Semerena, 2000, 2004). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Propionat-Metabolismus, sowohl von *E. coli*, als auch von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2, der Katabolit-Repression unterliegt (Lee et al., 2005).

B. subtilis kann nicht mit Propionat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (Sonenshein, 2002). Dennoch besitzt dieser Gene, welche Sequenzähnlichkeiten zu Genen des Methylcitratzyklus aufweisen (Bryan et al., 1996; Sonenshein, 2002). Diese sind in einem Operon zusammen mit Genen des Fettsäuremetabolismus (*mmgABC*) lokalisiert (Abb. 7.4 im Anhang; Bryan et al., 1996). Hierbei kodiert *mmgA* für eine degradative Acetoacetyl-CoA-Thiolase (Reddick & Williams, 2008), *mmgB* für eine 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase und *mmgC* für eine Acyl-CoA-Dehydrogenase. Induziert wird dieses Operon in den mittleren Stadien der Sporulation und steht unter der Kontrolle eines σ^E -abhängigen Promotors (Bryan et al., 1996). Des Weiteren wird vermutet, dass *B. subtilis* verzweigtkettige Fettsäuren über den Methylcitratzyklus zu Pyruvat und Succinat abbauen kann (Koburger et al., 2005).

Im Genom von *B. licheniformis* sind die Gene *mmgABC* nicht zusammen mit den Genen des putativen Methylcitratzyklus organisiert (Abb. 7.5 im Anhang). Begrenzt werden erstere *downstream* von dem Gen einer Acyl-CoA-Dehydrogenase (*acdA*) und *upstream* von *ywjF*. Dessen Produkt weist Ähnlichkeiten zu Eisen-Schwefel-bindenden Reduktasen auf. In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch Northern-Blot-Analysen gezeigt werden, dass die Gene des putativen Methylcitratzyklus (*mmgD*, *mmgE*, *yqiQ*) in DSM13 zusammen mit dem ORF des putativen transkriptionalen Regulator (BLi04093) ein Operon bilden. Daneben konnte die Funktionalität des Methylcitratzyklus durch Wachstumsversuche mit Propionat und Transkriptionsanalyse beobachtet werden (Wülfing, 2006).

Anders als für eine Mutation des Gens der Citratsynthase I (*citA*) beschrieben, konnte im Zusammenhang mit einer Mutation der kodierenden Einheit der (Methyl-) Citratsynthase III (*mmgD*) ein Phänotyp beobachtet werden (vgl. 4.6.). Beim Wachstum mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren zeigte die *mmgD*-Mutante, im Gegensatz zum Wildtyp DSM13 bzw. dessen Derivat MW3, ein diauxieähnliches Wachstum. Dieses konnte mit der Verwertung von Aminosäuren in Verbindung gebracht werden. Analysen der in diesem Zusammenhang entnommenen Kulturüberstände ergaben, dass die *mmgD*-Mutante in Anwesenheit von L-Asparagin das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp zeigte. Nachdem L-Asparagin nicht mehr bzw. nur in geringen Konzentrationen im Kulturüberstand zu detektieren war, konnte eine starke Reduktion der Wachstumsrate für diese Mutante beobachtet werden. Im Anschluss daran ging eine Zunahme der optischen Dichte mit dem gesteigerten Verbrauch der sechs verbliebenen Aminosäuren einher. Weitere Experimente zeigten außerdem, dass $\Delta mmgD$ nicht mehr in einem definierten Medium mit Glucose als Kohlenstoff- und Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle wachsen konnte (vgl. 4.6.). Eine Deletion der weiteren im Zusammenhang mit dem putativen Methylcitratzyklus stehenden Gene in DSM13 hatte keine offensichtliche Auswirkung auf das Wachstum in einem definierten Medium, sowohl mit einem Gemisch aus sieben Aminosäuren, als auch mit Glucose und Ammoniumchlorid (vgl. 4.6.). Weder für Δ BLi04093, noch für $\Delta mmgE$ und $\Delta yqiQ$ konnte in diesen Medien ein signifikanter Wachstumsunterschied, oder sogar Wachstumsdefekt, im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. In ersten Experimenten in einem definierten Medium mit Propionat als Kohlenstoffquelle konnte eine *yqiQ*-Mutante nicht kultiviert werden (Daten nicht gezeigt). Das Gen *yqiQ* kodiert

für eine putative Methylisocitrat-Lyase, welche die Umsetzung von Methylisocitrat zu Succinat und Pyruvat katalysiert. Diese Beobachtung unterstützt die Beteiligung des Operons am putativen Methylcitratzyklus in *B. licheniformis* DSM13.

Analysen der Kulturüberstände beim Wachstum mit sieben bzw. 20 Aminosäuren

Im Gegensatz zu einem komplexen Medium, wie zum Beispiel *nutrient broth*, welches zusätzlich noch Oligopeptide enthält, ist ein Vorteil eines definierten Mediums, dass dieses analytisch besser zugänglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein definiertes Medium zusammengestellt, welches der Aminosäure-Zusammensetzung der Sojabohne nachempfunden ist. Durch Probenentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums wurde der Verbrauch von Aminosäuren und die Bildung von Produkten analytisch überprüft. In diesem Kontext konnten viele Gemeinsamkeiten beim Wachstum von *B. licheniformis* DSM13 mit einem Gemisch aus sieben und aus 20 Aminosäuren beobachtet werden (vgl. 4.3.2.1. und 4.3.2.3.). Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass es eine Reihenfolge des Verbrauchs der Aminosäuren gibt. So wird in beiden Gemischen zunächst L-Asparagin verstoffwechselt und erst im Anschluss daran konnte ein gesteigerter Verbrauch der weiteren sechs proteinogenen Aminosäuren verzeichnet werden. Ausgehend von diesen sechs Aminosäuren ist L-Glutamat die letzte Aminosäure in beiden Gemischen, die noch im Kulturüberstand zu detektieren war. Wurde auch diese Aminosäure limitierend, so konnte beim Wachstum von DSM13 ein Übergang in die stationäre Phase beobachtet werden. Des Weiteren wurde, unabhängig vom Gemisch der Aminosäuren, eine Akkumulation und der anschließende Verbrauch von Ornithin in Abhängigkeit von L-Arginin ermittelt. Ebenfalls im Zusammenhang mit dem Verbrauch von L-Arginin konnte in beiden Medien ein Anstieg von Harnstoff im Kulturüberstand beobachtet werden. Daneben wurde ebenfalls eine Akkumulation von Ammonium und Acetat detektiert. Wie bereits im Zusammenhang mit der Verwertung von C2-Metaboliten erläutert, ist DSM13 in der Lage, Acetat als C-Quelle zu nutzen. Ein signifikanter Verbrauch von Acetat und Ammonium konnte jedoch unter den bisher gewählten Versuchsbedingungen nicht ermittelt werden.

Beim Wachstum von DSM13 mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren konnte ein Verbrauch der verzweigtkettigen Aminosäuren L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin beobachtet werden. In einer Konzentration von jeweils 30 mM in einem definierten

Medium konnte DSM13 diese einzeln nicht als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nutzen (vgl. 4.3.1.1.). Mit einem äquimolaren Gemisch (25 mM) dieser drei proteinogenen Aminosäuren konnte eine geringe Zunahme der Zelldichte ermittelt werden. Wurde diesem Medium 0,04% Casein-Hydrolysat zugefügt, konnte ein gesteigertes Wachstum im Vergleich mit nur 0,04% Casein-Hydrolysat, ohne die weitere Zugabe von Aminosäuren, beobachtet werden (Wülfing, 2006). Diese Experimente stehen im Einklang mit dem beim Wachstum mit 20 Aminosäuren gemachten Beobachtungen, dass es DSM13 möglich ist die verzweigt-kettigen Aminosäuren zu verwerten. Ob diese Aminosäuren in diesem Zusammenhang als N-Quelle und/oder als C-Quelle dienen, konnte jedoch nicht ermittelt werden.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für eine Reihe von Genen eine erhöhte Genexpression unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen ermittelt werden. Eine erhöhte Expression bekannter Gene in einem gemeinsamen Kontext mit uncharakterisierten Genen gestattet eine hypothetische funktionelle Zuordnung der letzteren. Deren genaue Rolle muss anschließend über molekularbiologische Techniken eingehend überprüft werden. Im Zusammenhang mit dem fermentativen Wachstum wären neben anderen die Pyruvat-Formiat-Lyase (BLi02132) ein interessanter Kandidat, um deren Funktion und Rolle in *B. licheniformis* näher zu beleuchten. Gleiches gilt für das in Verbindung mit der Verwertung von Aminosäuren beschriebene putative Operon um das Gen einer putativen Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase.

Beim Wachstum von *B. licheniformis* DSM13 in einem definierten Medium mit Gemischen von Aminosäuren können letztere sowohl als Stickstoff-, wie auch als Kohlenstoffquelle dienen. Um die Komponenten verwerten zu können, welche eine optimale Wachstumsrate ermöglichen, wird die Expression der an den Abbauwegen beteiligten Gene durch globale Regulatoren kontrolliert. In diesem Zusammenhang gilt es in weiteren Untersuchungen die Rolle des Regulatorproteins des C-Stoffwechsels, CcpA, aber auch von Proteinen, welche die Genexpression in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Stickstoff regulieren, zu untersuchen. Zu letzteren zählen die Proteine GlnR, TnrA und CodY.

6. Literaturverzeichnis

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.

Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Débarbouillé. 2004. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6887-6891.

Atkinson, M. R., and S. H. Fisher. 1991. Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**:23-27.

Baichoo, N., and D. Helmann. 2002. Recognition of DNA by Fur: a Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. *J. Bacteriol.* **184**:5826-5832.

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

Belitsky, B. R., and A. L. Sonenshein. 1998. Role and regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase genes. *J. Bacteriol.* **180**:6298–6305.

Belitsky, B. R., and A. L. Sonenshein. 1999. An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:10290–10295.

Belitsky, B. R., and A. L. Sonenshein. 2004. Modulation of Activity of *Bacillus subtilis* Regulatory Proteins GltC and TnrA by Glutamate Dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **186**:3399-3407.

Berberich, R., M. Kaback, and E. Freese. 1968. D-Amino Acids as Inducers of L-Alanine Dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **243**:1006-1011.

Blalock, E. 2003. A beginner's guide to microarrays. Kluwer Academy Publishers; Boston/ New York/ Dordrecht/ London.

Blasco, R., J. Cárdenas, and F. Castillo. 1991. Regulation of isocitrate lyase in *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Curr. Microbiol.* **22**:73-76.

Blencke, H.-M., I. Reif, F. M. Commichau, C. Detsch, I. Wacker, H. Ludwig, J. Stülke. 2006. Regulation of *citB* expression in *Bacillus subtilis*: integration of multiple metabolic signals in the citrate pool and by the general nitrogen regulatory system. *Arch. Microbiol.* **185**:136–146.

- Blomqvist, K., M. Nikkola, P. Lehtovaara, M.-L. Suihko, U. Airaksinen, K. B. Straby, J. K. C. Knowles, and M. E. Penttilä.** 1993. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* **175**:1392-1404.
- Böck, A. and G. Sawers.** 1996. Fermentation. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp.262-282.
- Box, G.** 2006. Herstellung rekombinanter Clostridien-Sporen zur Therapie nekrotisierender Tumore. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm.
- Brämer, C. O., and A. Steinbüchel.** 2001. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. *Microbiology.* **147**:2203-2214.
- Broman, K., N. Lauwers, V. Stalon, and J.-M. Wiame.** 1978. Oxygen and Nitrate in Utilization by *Bacillus licheniformis* of the Arginase and Arginine Deiminase Routes of Arginine Catabolism and Other Factors Affecting Their Syntheses. *J. Bacteriol.* **135**:920-927.
- Brown, T. D. K., M. C. Jones-Mortimer, and H. L. Kornberg.** 1977. The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **102**:327-336.
- Bryan, E. M., B. W. Beall, and C. P. Moran, Jr.** 1996. A σ^E -Dependent Operon Subject to Catabolite Repression during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**:4778-4786.
- Buhrmester, J.** 2004. Genomweite Analysen von Gen-Clustern zur ABC-Transport-vermittelten Eisenaufnahme bei *Sinorhizobium meliloti* Stamm Rm1021. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.
- Calogero, S., R. Gardan, P. Glaser, J. Schweizer, G. Rapoport, and M. Débarbouillé.** 1994. RocR, a Novel Regulatory Protein Controlling Arginine Utilization in *Bacillus subtilis*, Belongs to the NtrC/NifA Family of Transcriptional Activators. *J. Bacteriol.* **176**:1234-1241.
- Campbell, H. A., L. T. Mashburn, E. A. Boyse, and L. J. Old.** 1967. Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity. *Biochemistry.* **6**:721-730.
- Cedar, H., and J. H. Schwartz.** 1967. Localization of the Two L-Asparaginases in Anaerobically Grown *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **242**:3753-3755.

Chang, S., and S. N. Cohen. 1979. High Frequency Transformation of *Bacillus subtilis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Molec. gen. Genet.* **168**:111–115.

Chell, R. M., and T. K. Sundaram. 1975. Isolation and characterization of isocitrate lyase and malate synthase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. Soc. Trans.* **3**:303-306.

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. Süßmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk, and R. Borriss. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.* **25**:1007-1014.

Chung, T., D. J. Klumpp, and D. C. LaPorte. 1988. Glyoxylate bypass operon of *Escherichia coli*: cloning and determination of the functional map. *J. Bacteriol.* **170**:386-392.

Claes, W. A., A. Pühler, and J. Kalinowski. 2002. Identification of Two *prpDBC* Gene Clusters in *Corynebacterium glutamicum* and Their Involvement in Propionate Degradation via the 2-Methylcitrate Cycle. *J. Bacteriol.* **184**:2728-2739.

Clark, V. L., D. E. Peterson, and R. W. Bernlohr. 1972. Changes in Free Amino Acid Production and Intracellular Amino Acid Pools of *Bacillus licheniformis* as a Function of Culture Age and Growth Media. *J. Bacteriol.* **112**:715-725.

Cook, W. R., J. H. Hoffman, and R. W. Bernlohr. 1981. Occurrence of an Inducible Glutaminase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **148**:365-367.

Cruz Ramos, H., L. Boursier, I. Moszer, F. Kunst, A. Danchin, and P. Glaser. 1995. Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *EMBO J.* **14**:5984–5994.

Cruz Ramos, H., P. Glaser, L. V. Wray, Jr, and S. H. Fisher. 1997. The *Bacillus subtilis ureABC* Operon. *J. Bacteriol.* **179**:3371-3373.

Cruz Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser, and D. Jahn. 2000. Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. *J. Bacteriol.* **182**:3072-3080.

Cunin, R., N. Glansdorff, A. Piérard, and V. Stalon. 1986. Biosynthesis and Metabolism of Arginine in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **50**:314-352.

Débarbouillé, M., I. Martin-Verstraete, F. Kunst, and G. Rapoport. 1991. The *Bacillus subtilis sigL* gene encodes an equivalent of σ^{54} from Gram-negative bacteria. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA.* **88**:9092-9096.

Débarbouillé, M., R. Gardan, M. Arnaud, and G. Rapoport. 1999. Role of BkdR, a Transcriptional Activator of The SigL-Dependent Isoleucine and Valine Degradation Pathway in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:2059-2066.

Deng, W.-L., H.-Y. Chang, and H. L. Peng. 1994. Acetoin catabolic system of *Klebsiella pneumoniae* CG43: sequence, expression, and organization of the *aco* operon. *J. Bacteriol.* **176**:3527–3535.

Diesterhaft, M. D., and E. Freese. 1973. Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **248**:6062–6070.

Donohue, T. J., and R. W. Bernlohr. 1981. Properties of the *Bacillus licheniformis* A5 glutamine synthetase purified from cells grown in the presence of ammonia or nitrate. *J. Bacteriol.* **147**:589-601.

Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**:584-588.

Ehrenreich, A. 2006. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**:255-273.

Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial applications. *Trends Biotechnol.* **10**:208-217.

Fisher, S. H. 1993. Utilization of Amino Acids and Other Nitrogen-Containing Compounds. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC, Am. Soc. Microbiol.), pp.221-228.

Fisher, S. H., and M. Débarbouillé. 2002. Nitrogen Source Utilization and Its Regulation. In *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives, A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 181-191.

Fisher, S. H., and B. Magasanik. 1984. 2-Ketoglutarate and the Regulation of Aconitase and Histidase Formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **158**:379-382.

Fisher, S. H., and L. V. Wray, Jr. 2002. *Bacillus subtilis* 168 Contains Two Differentially Regulated Genes Encoding L-Asparaginase. *J. Bacteriol.* **184**:2148-2154.

Fitzpatrick J. M., D. A. Johnston, G. W. Williams, D. J. Williams, T. C. Freeman, D. W. Dunne and K. F. Hoffmann. 2005. An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. *Molecular and Biochemical Parasitology* **141**:1-13.

Folmsbee, M. J., M. J. McInerney, and D. P. Nagle. 2004. Anaerobic growth of *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis* requires deoxyribonucleosides or DNA. *Appl. Envir. Microbiol.* **70**:5252-5257.

- Fouet, A., and A. L. Sonenshein.** 1990. A target for carbon source-dependent negative regulation of the *citB* promoter in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**:835-844.
- Fouet, A., A. Klier, and G. Rapoport.** 1986. Nucleotide sequence of the sucrase gene of *Bacillus subtilis*. *Gene.* **45**:221-225.
- Fouet, A., M. Arnaud, A. Klier, and G. Rapoport.** 1987. *Bacillus subtilis* sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system: Expression in *Escherichia coli* and homology to enzymes II from enteric bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:8773-8777.
- Fouet, A., S. Jin, G. Raffel, and A. L. Sonenshein.** 1990. Multiple regulatory sites in the *Bacillus subtilis citB* promoter region. *J. Bacteriol.* **172**:5408-5415.
- Fox, D.K., and S. Roseman.** 1986. Isolation and characterization of homogeneous acetate kinase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**:13487-13497.
- Froyshov, O., and S. G. Laland.** 1974. On the biosynthesis of bacitracin by a soluble enzyme complex from *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.* **46**:235-242.
- Gaballa, A., and J. D. Helmann.** 2007. Substrate induction of siderophore transport in *Bacillus subtilis* mediated by a novel one-component regulator. *Mol. Microbiol.* **66**:164-173.
- Gardan, R., G. Rapoport, and M. Débarbouillé.** 1995. Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **249**:843-856.
- Gay, P., and A. Delobbe.** 1977. Fructose transport in *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **79**:363-373.
- Golden, K. J., and R. W. Bernlohr.** 1985. Nitrogen Catabolite Repression of the L-Asparaginase of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **164**:938-940.
- Goodlove, P. E., P. R. Cunningham, J. Parker, and D.P. Clark.** 1989. Cloning and sequence analysis of the fermentative alcohol-dehydrogenase-encoding gene of *Escherichia coli*. *Gene.* **85**:209-214.
- Gotto, A. M., and H. L. Kornberg.** 1961. The Metabolism of C2 Compounds in Micro-Organisms. 7. Preparation and Properties of Crystalline Tartronic Semialdehyde Reductase. *Biochem. J.* **81**:273-284.
- Gottschalk, G.** 1986. *Bacterial Metabolism*, Second Edition (New York, Springer-Verlag).
- Grundy, F. J., D. A. Waters, S. H. G. Allen, and T. M. Henkin.** 1993a. Regulation of the *Bacillus subtilis* Acetate Kinase Gene by CcpA. *J. Bacteriol.* **175**:7348-7355.

Grundy, F. J., D. A. Waters, T. Y. Takova, and T. M. Henkin. 1993b. Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10**:259-271.

Gyan, S., Y. Shiohira, I. Sato, M. Takeuchi, and T. Sato. 2006. Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD⁺ ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**:7062–7071.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580.

Hansen, E. J., and E. Juni. 1974. Two routes for synthesis of phosphoenol-pyruvate from C4-dicarboxylic acids in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**:1204–1210.

Hansen, E. J., and E. Juni. 1975. Isolation of mutants of *Escherichia coli* lacking NAD- and NADP-linked malic enzyme activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**:559–566.

Helmann, J. D., and C. P. Moran Jr. 2002. RNA Polymerase and sigma factors. In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives*, A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 289-312.

Hemmilä, I. A., and P. I. Mäntsälä. 1978. Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* **173**:45-52.

Holtmann, G., and E. Bremer. 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by Exogenously Provided Glycine Betaine and Structurally Related Compatible Solutes: Involvement of Opu Transporters. *J. Bacteriol.* **186**:1683-1693.

Holtzclaw, W. D., and L. F. Chapman. 1975. Degradative Acetolactate Synthase of *Bacillus subtilis*: Purification and Properties. *J. Bacteriol.* **121**:917-922.

Homuth, G., A. Rompf, W. Schumann, and D. Jahn. 1999. Transcriptional control of *Bacillus subtilis hemN* and *hemZ*. *J. Bacteriol.* **181**:5922–5929.

Horswill, A. R., and J. C. Escalante-Semerena. 1997. Propionate Catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: Two Divergently Transcribed Units Comprise the *prp* Locus at 8.5 Centisomes, *prpR* Encodes a Member of the Sigma-54 Family of Activators, and the *prpBCDE* Genes Constitute an Operon. *J. Bacteriol.* **179**:928-940.

Horswill, A. R., and J. C. Escalante-Semerena. 1999a. *Salmonella typhimurium* LT2 Catabolizes Propionate via the 2-Methylcitric Acid Cycle. *J. Bacteriol.* **181**:5615-5623.

Horswill, A. R., and J. C. Escalante-Semerena. 1999b. The *prpE* gene of *Salmonella typhimurium* LT2 encodes propionyl-CoA synthetase. *Microbiology.* **145**:1381-1388.

Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. **77**:61-68.

Huang, M., F. B. Opermann-Sanio, and A. Steinbüchel. 1999. Biochemical and Molecular Characterization of the *Bacillus subtilis* Acetoin Catabolic Pathway. *J. Bacteriol.* **181**:3837-3841.

Huang, W. M., and J. Marmur. 1970. Characterization of Inducible Bacteriophages in *Bacillus licheniformis*. *J. Virol.* **5**:237-246.

Ivanova, N., A. Sorokin, I. Anderson, N. Galleron, B. Candelon, V. Kapatral, A. Bhattacharyya, G. Reznik, N. Mikhailova, A. Lapidus, L. Chu, M. Mazur, E. Goltsman, N. Larsen, M. D. Souza, T. Walunas, Y Grechkin, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, S. D. Ehrlich, R. Overbeek, and N. Kyrpides. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*. **423**:87-91.

Jin, S., and A. L. Sonenshein. 1994a. Identification of Two Distinct *Bacillus subtilis* Citrate Synthase Genes. *J. Bacteriol.* **176**:4669-4679.

Jin, S., and A. L. Sonenshein. 1994b. Transcriptional Regulation of *Bacillus subtilis* Citrate Synthase Genes. *J. Bacteriol.* **176**:4680-4690.

Jin, S., and A. L. Sonenshein. 1996. Characterization of the Major Citrate Synthase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**:3658-3660.

Kaiser, M., and G. Sawers. 1995. Fnr activates transcription from the P6 promoter of the pfl operon *in vitro*. *Mol. Microbiol.* **18**:331-342.

Klinger, A., J. Schirawski, P. Glaser, and G. Uden. 1998. The *fnr* of *Bacillus licheniformis* and the cysteine ligands of the C-terminal FeS cluster. *J. Bacteriol.* **180**:3483-3485.

Knappe, J., F. A. Neugebauer, H. P. Blaschkowski, and M. Gänzler. 1984. Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:1332-1335.

Kessler, D., and J. Knappe. 1996. Anaerobic Dissimilation of Pyruvate. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 199-205.

Kessler, D., I. Leibrecht, and J. Knappe. 1991. Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*. *FEBS Lett.* **281**:59-63.

Kessler, D., W. Herth, and J. Knappe. 1992. Ultrastructure and pyruvate formate-lyase radical quenching property of the multienzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:18073-18079.

Koburger, T., J. Weibezahn, J. Bernhardt, G. Homuth, and M. Hecker. 2005. Genome-wide mRNA profiling in glucose starved *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Gen. Genomics.* **274**:1-12.

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

Krüger, N., F. B. Oppermann, H. Lorenzl, and A. Steinbüchel. 1994. Biochemical and Molecular Characterization of the *Clostridium magnum* Acetoin Dehydrogenase Enzyme System. *J. Bacteriol.* **176**:3614-3630.

Laishley, E. J., and R. W. Bernlohr. 1968. Regulation of Arginine and Proline Catabolism in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **96**:322-329.

Lander, E. S. 1999. Array of hope. *Nat. Genet.* **21**:3-4.

Lapidus A, E. Goltsman, S. Auger, N. Galleron, B. Ségurens, C. Dossat, M. L. Landa, V. Broussolle, J. Brillard, M.-H. Guinebretiere , V. Sanchis, C. Nguen-The, D. Lereclus, P. Richardson, P. Wincker, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin. 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **171**:236-249.

Larsson, J. T., A. Rogstam, and C. von Wachenfeldt. 2005. Coordinated patterns of cytochrome *bd* and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **151**:3323-3335.

Lederberg, E. M., and S. N. Cohen. 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *J. Bacteriol.* **119**:1072-1074.

Lee, S. K., J. D. Newman, and J. D. Keasling. 2005. Catabolite Repression of the Propionate Catabolic Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Evidence for Involvement of the Cyclic AMP Receptor Protein. *J. Bacteriol.* **187**:2793-2800.

Lerondel, G., T. Doan, N. Zamboni, U. Sauer, and S. Aymerich. 2006. YtsJ Has the Major Physiological Role of the Four Paralogous Malic Enzyme Isoforms in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**:4727-4736.

Lindgren, V., and L. Rutberg. 1975. Glycerol Metabolism in *Bacillus subtilis*: Gene-Enzyme Relationships. *J. Bacteriol.* **119**:431-442.

Maghnoij, A., T. Franco de Sousa Cabral, V. Stalon, and C. V. Wauven. 1998. The *arcABDC* Gene Cluster, Encoding the Arginine Deiminase Pathway of *Bacillus licheniformis*, and Its Activation by the Arginine Repressor ArgR. *J. Bacteriol.* **180**:6468-6475.

Marcus, M., and Y. S. Halpern. 1969. The metabolic pathway of glutamate in *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta.* **177**:314-320.

Marino, M., H. Cruz Ramos, T. Hoffmann, P. Glaser, and D. Jahn. 2001. Modulation of Anaerobic Energy Metabolism of *Bacillus subtilis* by *arfM* (*ywiD*). *J. Bacteriol.* **183**:6815-6821.

Marino, M., T. Hoffmann, R. Schmid, H. Möbitz, and D. Jahn. 2000. Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiology.* **146**:97-105.

Martin-Verstraete, I., M. Débarbouillé, A. Klier, and G. Rapoport. 1990. Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon. *J. Mol. Biol.* **214**:657-671.

Martinez, J. L., M. Herrero, and V. de Lorenzo. 1994. The organization of intercistronic regions of the aerobactin operon of pColV-K30 may account for the differential expression of the *iucABCD iutA* genes. *J. Mol. Biol.* **238**:288-293.

May, J. J., T. M. Wendrich, and M. A. Marahiel. 2001. The *dhb* Operon of *Bacillus subtilis* Encodes the Biosynthetic Template for the Catecholic Siderophore 2,3-Dihydroxybenzoate-Glycine-Threonine Trimeric Ester Bacillibactin. *J. Biol. Chem.* **276**:7209-7217.

McCowen, S. M., and P. V. Phibbs, Jr. 1974. Regulation of Alanine Dehydrogenase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **118**:590-597.

McFall, E., and E. B. Newman. 1996. Amino Acids as Carbon Sources. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp.358-379.

Miethke, M., O. Klotz, U. Linne, J. J. May, C. L. Beckering, and M. A. Marahiel. 2006. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **61**:1413-1427.

Morrison, D.A. 1977. Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic Preservation of Competent Cells. *J. Bacteriol.* **132**:349-351.

Mobley, H. L. T., M. D. Island, and R. P. Hausinger. 1995. Molecular Biology of Microbial Ureasas. *Microbiol. Rev.* **59**:451-480.

- Münch, R., K. Hiller, A. Grote, M. Scheer, J. Klein, M. Schobert, and D. Jahn.** 2005. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* **21**:4187-4189.
- Nakano, M. M., and P. Zuber.** 1998. Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:165–190.
- Nakano, M. M., P. Zuber, P. Glaser, A. Danchin, and F. M. Hulett.** 1996. Two-Component Regulatory Proteins ResD-ResE Are Required for Transcriptional Activation of *fnr* upon Oxygen Limitation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**:3796-3802.
- Nakano, M. M., Y. P. Dailly, P. Zuber, and D. P. Clark.** 1997. Characterization of Anaerobic Fermentative Growth of *Bacillus subtilis*: Identification of Fermentation End Products and Genes Required for Growth. *J. Bacteriol.* **179**:6749-6755.
- Nakano, M. M., T. Hoffmann, Y. Zhu, and D. Jahn.** 1998. Nitrogen and Oxygen Regulation of *Bacillus subtilis nasDEF* Encoding NADH-Dependent Nitrite Reductase by TnrA and ResDE. *J. Bacteriol.* **180**:5344-5350.
- Needleman, S. B., and C. D. Wunsch.** 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**:443–453.
- Nicholson, W. L.** 2008. The *Bacillus subtilis ydjL (bdhA)* Gene Encodes Acetoin Reductase/2,3-Butanediol Dehydrogenase. *Appl. Envir. Microbiol.* **74**:6832-6838.
- Nitta, Y., Y. Yasuda, K., Tochikubo, and Y. Hachisuka.** 1974. L-Amino Acid Dehydrogenases in *Bacillus subtilis* Spores. *J. Bacteriol.* **117**:588-592.
- Nnyepi, M. R., Y. Peng, and J. B. Broderick.** 2007. Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: role of AdhE and small molecules. *Arch. Biochem. Biophys.* **459**:1-9.
- Ochieng, D. J.** 2007. Comparative analysis of amino acid utilization in *E.coli* and *Bacillus* strains. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August Universität, Göttingen.
- O’Connor, R. J., and H. O. Halvorson.** 1960. Intermediate metabolism of aerobic spores. V. The purification and properties of L-alanine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **91**:290-299.
- Oh, M. K., L. Rohlin, K. C. Kao, and J. C. Liao.** 2002. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**:13175-13183.
- Ohné, M.** 1974. Regulation of Aconitase Synthesis in *Bacillus subtilis*: Induction, Feedback Repression, and Catabolite Repression. *J. Bacteriol.* **117**:1295-1305.
- Ohné, M.** 1975. Regulation of the Dicarboxylic Acid Part of the Citric Acid Cycle in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **122**:224-234.

- Oppermann, F. B., B. Schmidt, and A. Steinbüchel.** 1991. Purification and characterization of acetoin: 2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase, dihydrolipoamide dehydrogenase, and dihydrolipoamide acetyltransferase of the *Pelobacter carbinolicus* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J. Bacteriol.* **173**:757-767.
- Oppermann, F. B., and A. Steinbüchel.** 1994. Identification and molecular characterization of the *aco* genes encoding the *Pelobacter carbinolicus* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J. Bacteriol.* **176**:469-485.
- Ould Ali, N., J. Bignon, G. Rapoport, and M. Débarbouillé.** 2001. Regulation of the Acetoin Catabolic Pathway Is Controlled by Sigma L in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:2497-2504.
- Ould Ali, N., J. Jeusset, E. Larquet, E. Le Cam, B. Belitsky, A. L. Sonenshein, T. Msadek, and M. Débarbouillé.** 2003. Specificity of the interaction of RocR with the *rocG-rocA* intergenic region in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **149**:739-750.
- Palacios, S., and J. C. Escalante-Semerena.** 2000. *prpR*, *ntrA*, and *ihf* Functions Are Required for Expression of the *prpBCDE* Operon, Encoding Enzymes That Catabolize Propionate in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. *J. Bacteriol.* **182**:905-910.
- Palacios, S., and J. C. Escalante-Semerena.** 2004. 2-Methylcitrate-dependent activation of the propionate catabolic operon (*prpBCDE*) of *Salmonella enterica* by the PrpR protein. *Microbiology.* **150**:3877-3887.
- Pawar, S., and H. Schulz.** 1981. The Structure of the Multienzyme Complex of Fatty Acid Oxidation from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**:3894-3899.
- Phibbs Jr, P. V., and R. W. Bernlohr.** 1971. Purification, Properties, and Regulation of Glutamic Dehydrogenase of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **106**:375-385.
- Powell, J. F., and J. R. Hunter.** 1955. Spore germination in the genus *Bacillus*: the modification of germination requirements as a result of preheating. *J. Gen. Microbiol.* **13**:59-67.
- Pramanik, A., S. Pawar, E. Antonian, and H. Schulz.** 1979. Five Different Enzymatic Activities Are Associated with the Multienzyme Complex of Fatty Acid Oxidation from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **137**:469-473.
- Presecan-Siedel, E., A. Galinier, R. Longin, J. Deutscher, A. Danchin, P. Glaser, and I. Martin-Verstraete.** 1999. Catabolite Regulation of the *pta* Gene as Part of Carbon Flow Pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:6889-6897.
- Priever, U. B., R. Simon, and A. Pühler.** 1985. Extension of the Host Range of *Escherichia coli* Vectors by Incorporation of RSF1010 Replication and Mobilization Functions. *J. Bacteriol.* **163**:324-330.

- Priefert, H., S. Hein, N. Krüger, K. Zeh, B. Schmidt, and A. Steinbüchel.** 1991. Identification and molecular characterization of the *Alcaligenes eutrophus* H16 *aco* operon genes involved in acetoin catabolism. *J. Bacteriol.* **173**:4056–4071.
- Priest, F. G.** 1993. Systematics and Ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC, Am. Soc. Microbiol.), pp. 3-15.
- Puri-Taneja, A., M. Schau, Y. Chen, and F. M. Hulett.** 2007. Regulators of the *Bacillus subtilis* *cydABCD* Operon: Identification of a Negative Regulator, CcpA, and a Positive Regulator, ResD. *J. Bacteriol.* **189**:3348-3358.
- Rachinger, M.** 2010. Stammdesign in *B. licheniformis*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August Universität, Göttingen.
- Ratzkin, B., and J. Roth.** 1978. Cluster of Genes Controlling Proline Degradation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **133**:744-754.
- Reddick, J. J., and J. K. Williams.** 2008. The *mmgA* gene from *Bacillus subtilis* encodes a degradative acetoacetyl-CoA thiolase. *Biotechnol Lett.* **30**:1045-1050.
- Reents, H., R. Münch, T. Dammeyer, D. Jahn, and E Härtig.** 2006. The Fnr Regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**:1103-1112.
- Reinscheid, D. J., B. J. Eikmanns, and H. Sahn.** 1994a. Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J. Bacteriol.* **176**:3474-3483.
- Reinscheid, D. J., B. J. Eikmanns, and H. Sahn.** 1994b. Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology.* **140**:3099-3108.
- Renna, M. C., N. Najimudin, L. R. Winik, and S. A. Zahler.** 1993. Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* Genes Involved in Post-Exponential-Phase Production of Acetoin. *J. Bacteriol.* **175**:3863-3875.
- 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. Groth Clausen, P. B. Olsen, M. D. Rasmussen, J. T. Andersen, P. L. Jørgensen, T. S. Larsen, A. Sorokin, A. Bolotin, A. Lapidus, N. Galleron, S. D. Ehrlich, and R. M. Berka.** 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* **5**:R77.
- Rosenkrantz, M. S., D. W. Dingman, and A. L. Sonenshein.** 1985. *Bacillus subtilis* *citB* gene is regulated synergistically by glucose and glutamine. *J. Bacteriol.* **164**:155-164.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Sandeman, R. A., M. J. Hynes, J. R. Fincham, and I. F. Connerton.** 1991. Molecular organisation of the malate synthase genes of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. **228**:445-452.
- Satomura, T., D. Shimura, K. Asai, Y. Sadaie, K. Hirooka and Y. Fujita.** 2005. Enhancement of glutamine utilization in *Bacillus subtilis* through the GlnK-GlnL two-component regulatory system. J. Bacteriol. **187**:4813-4821.
- Sawers, G., and B. Suppmann.** 1992. Anaerobic Induction of Pyruvate Formate-Lyase Gene Expression Is Mediated by the ArcA and FNR Proteins. J. Bacteriol. **174**:3474-3478.
- Schau, M., Y. Chen, and F. M. Hulett.** 2004. *Bacillus subtilis* YdiH Is a Direct Negative Regulator of the *cydABCD* Operon. J. Bacteriol. **186**:4585-4595.
- Schmidt, V.** 2005. Untersuchungen zur Regulation des Glyoxylatzyklus in *Bacillus licheniformis* DSM13. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August Universität, Göttingen.
- Schreier, H. J., and R. W. Bernlohr.** 1984. Purification and Properties of Glutamate Synthase from *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol. **160**:591-599.
- Schreier, H. J., T. M. Smith, and R. W. Bernlohr.** 1982. Regulation of Nitrogen Catabolic Enzymes in *Bacillus* spp. J. Bacteriol. **151**: 971-975.
- Schulp, J. A., and A. H. Stouthamer.** 1970. The Influence of Oxygen, Glucose and Nitrate upon the Formation of Nitrate Reductase and the Respiratory System in *Bacillus licheniformis*. Microbiology. **64**:195-203.
- Schwarzer, M.** 2005. Untersuchungen zum anaeroben fermentativen Wachstum von *Bacillus licheniformis* DSM13. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August Universität, Göttingen.
- Shariati, P., W. J. Mitchell, A. Boyd, and F. G. Priest.** 1995. Anaerobic metabolism in *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. Microbiology. **141**:1117-1124.
- Sharma, V., S. Sharma, K. Hoener zu Bentrup, J. D. McKinney, D. G. Russell, W.R. Jacobs, Jr., and J. C. Sacchettini.** 2000. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat. Struct. Biol. **7**:663-668.
- Simon, J. P., and V. Stalon.** 1976. Purification and structure of arginase of *Bacillus licheniformis*. Biochimie. **58**:1419-1421.
- Skraly, F. A., and D. C. Cameron.** 1998. Purification and Characterization of a *Bacillus licheniformis* Phosphatase Specific for D- α -Glycerophosphate. Arch. Biochem. Biophys. **349**:27-35.

- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt.** 1986. Bergey 's manual of sytematic bacteriology, Vol 2 (Baltimore, Williams & Wilkins).
- Sonenshein, A. L.** 2002. The Krebs Citric Acid Cycle. In *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives, A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC, American Society for Microbiology), pp. 151-161.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Spring, K. J., P. G. Jerlström, D. M. Burns, and I. R. Beacham.** 1986. L-asparaginase genes in *Escherichia coli*: isolation of mutants and characterization of the *ansA* gene and its protein product. *J. Bacteriol.* **166**:135-142.
- Steinmetz, M.** 1993. Carbohydrate Catabolism: Pathways, Enzymes, Genetic Regulation, and Evolution. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC, Am. Soc. Microbiol.), pp. 157-170.
- Stines-Chaumeil, C., F. Talfournier, and G. Branlant.** 2006. Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **395**:107-115.
- Sun, D., and P. Setlow.** 1991. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the *Bacillus subtilis ans* Operon, Which Codes for L-Asparaginase and L-Aspartase. *J. Bacteriol.* **173**:3831-3845.
- Sun, D., and P. Setlow.** 1993. Cloning and Nucleotide Sequence of the *Bacillus subtilis ansR* Gene, Which Encodes a Repressor of the *ans* Operon Coding for L-Asparaginase and L-Aspartase. *J. Bacteriol.* **175**:2501-2506.
- Sun, G., E. Sharkova, R. Chesnut, S. Birkey, M. F. Duggan, A. Sorokin, P. Pujic, S. D. Ehrlich, and F. M. Hulett.** 1996. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**:1374-1385.
- Sun, X., R. Eliasson, E. Pontis, J. Andersson, G. Buist, B.-M. Sjöberg, and P. Reichard.** 1995. Generation of the glycy radical of the anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme. *J. Biol. Chem.* **270**:2443-2446.
- Tabuchi, T., and N. Serizawa.** 1975. A Hypothetical Cyclic Pathway for the Metabolism of Odd-carbon *n*-Alkanes or Propionyl-CoA via Seven-carbon Tricarboxylic Acids in Yeasts. *Agr. Biol. Chem.* **39**:1055-1061.
- Talaat, A. M., S. T. Howard, W. Hale IV, R. Lyons, H. Garner, and S. A. Johnston.** 2002. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Research.* **30**:1-9.

Textor, S., V. F. Wendisch, A. A. De Graaf, U. Müller, M. I. Linder, D. Linder, and W. Buckel. 1997. Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch. Microbiol.* **168**: 428-436.

Tschech, A., and N. Pfennig. 1984. Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* **137**:163-167.

Torrents, E., G. Buist, A. Liu, R. Eliasson, J. Kok, I. Gibert, A. Gräslund, and P. Reichard. 2000. The anaerobic (class III) ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis*. Catalytic properties and allosteric regulation of the pure enzyme system. *J. Biol. Chem.* **275**:2463-2471.

Vanderwinkel, E., P. Liard, F. Ramos, and J. M. Wiame. 1963. Genetic control of the regulation of isocitritase and malate synthase in *Escherichia coli* K 12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**:157-162.

Veith, B. 2004. Genom- und Transkriptionsanalyse von *Bacillus licheniformis* DSM13 – einem Organismus mit großem industriellem Potential. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August Universität, Göttingen.

Veith, B., C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche, K. H. Maurer, P. Ehrenreich, S. Bäumer, A. Henne, H. Liesegang, R. Merkl, A. Ehrenreich, and G. Gottschalk. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**:204-211.

Villafane, R., D. H. Bechhofer, C. S. Narayanan, and D. Dubnau. 1987. Replication Control Genes of Plasmid pEI94. *J. Bacteriol.* **169**:4822-4829.

Voigt, B., T. Schweder, M. J. J. B. Sibbald, D. Albrecht, A. Ehrenreich, J. Bernhardt, J. Feesche, K. H. Maurer, G. Gottschalk, J. Maarten van Dijl, and M. Hecker. 2006. The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media and under different nutrient starvation conditions. *Proteomics.* **6**:268-281.

von Blohn, C., B. Kempf, R. M. Kappes, and E. Bremer. 1997. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol. Microbiol.* **25**:175-187.

von Wachenfeldt, C., and L. Hederstedt. 2002. Respiratory Cytochromes, Other Heme Proteins, and Heme Biosynthesis. In *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives, A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC, American Society for Microbiology), pp. 163-179.

Wacker, I., H. Ludwig, I. Reif, H.-M. Blencke, C. Detsch, and J. Stülke. 2003. The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology.* **149**:3001-3009.

Wagner, A. F. V., M. Frey, F. A. Neugebauer, W. Schäfer, and J. Knappe. 1992. The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:996-1000.

Wang, E., M. C. Bauer, A. Rogstam, S. Linse, D. T. Logan, and C. von Wachenfeldt. 2008. Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. *Mol. Microbiol.* **69**:466-478.

Waschkau, B., J. Waldeck, S. Wieland, R. Eichstädt, and F. Meinhardt. 2008. Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**:181-188.

Wendisch, V. F., M. Spies, D. J. Reinscheid, S. Schnicke, H. Sahm, and B. J. Eikmanns. 1997. Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch. Microbiol.* **168**:262-269.

Westerfeld, W. W. 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.* **161**:495-502.

Winstedt, L., K. Yoshida, Y. Fujita, and C. von Wachenfeldt. 1998. Cytochrome *bd* biosynthesis in *Bacillus subtilis*: characterization of the *cydABCD* operon. *J. Bacteriol.* **180**:6571-6580.

Wood, J. M. 1981. Genetics of L-Proline Utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **146**:895-901.

Wood, J. M. 1988. Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J. Membr. Biol.* **106**:183-202.

Wülfing, E. 2006. Expression und transkriptionelle Organisation der am Wachstum auf Acetat und Propionat bei *Bacillus licheniformis* beteiligten Gene. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August Universität, Göttingen.

Ye, R. W., W. Tao, L. Bedzyk, T. Young, M. Chen, and L. Li. 2000. Global Gene Expression Profiles of *Bacillus subtilis* Grown under Anaerobic Conditions. *J. Bacteriol.* **182**:4458-4465.

Yoshida, K., M. Yamaguchi, T. Morinaga, M. Kinehara, M. Ikeuchi, H. Ashida, and Y. Fujita. 2008. *myo*-Inositol Catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **283**:10415-10424.

Yuuki, T., T. Nomura, H. Tezuka, A. Tsuboi, H. Yamagata, N. Tsukagoshi, and S. Udaka. 1985. Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable alpha-amylase of *Bacillus licheniformis*: comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying alpha-amylases deduced from the DNA sequences. *J. Biochem. (Tokyo)* **98**:1147-1156.

7. Anhang

Tabelle 7.1: Expressionsverhältnisse von Genen, die an der Glycolyse beteiligt sind. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression unter aeroben Bedingungen, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

n.b. – nicht bestimmt

ID	Gen	Funktion	log Expressionsverhältnis (aerob/anaerob)
BLi01598	<i>ptsG</i>	Untereinheit PTS-System	1,53
BLi01599	<i>ptsH</i>	Untereinheit PTS-System	0,45
BLi01600	<i>ptsI</i>	Untereinheit PTS-System	0,43
BLi02660	<i>glcK</i>	Glucose-Kinase	-0,08
BLi03052	<i>gapB</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	n.b.
BLi03067	<i>pykA</i>	Pyruvat Kinase	-0,90
BLi03068	<i>pfkA</i>	6-Phosphofruktokinase	-0,42
BLi03314	<i>pgi</i>	Glucose-6-Phosphat-Isomerase	-0,92
BLi03661	<i>eno</i>	Enolase	0,55
BLi03662	<i>pgm</i>	Phosphoglycerat-Mutase	0,48
BLi03663	<i>tpiA</i>	Triosephosphat-Isomerase	0,01
BLi03664	<i>pgk</i>	Phosphoglycerat-Kinase	0,73
BLi03665	<i>gapA</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	-0,52
BLi03960	<i>fbaA</i>	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	-0,99

Tabelle 7.2: Vergleichende Darstellung der Genregion des *aco*-Operons beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. put. - putativ

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			Acetat / Glucose	2,3-Butandiol / Glucose
BLi00848		put. intrazelluläre Protease	-0,04	-1,99
BLi00849	<i>acoA</i>	Acetoin-Dehydrogenase (TPP-abhängige α -Untereinheit)	4,66	8,14
BLi00850	<i>acoB</i>	Acetoin-Dehydrogenase (TPP-abhängige β -Untereinheit)	4,80	8,64
BLi00851	<i>acoC</i>	Acetoin-Dehydrogenase (Dihydrolipoamid- Acetyltransferase)	3,54	7,99
BLi00852	<i>acoL</i>	Acetoin-Dehydrogenase (Dihydrolipoamid- Dehydrogenase)	3,86	7,83
BLi00853	<i>acoR</i>	transkriptionaler Aktivator des Acetoin-Dehydrogenase Operons	2,58	4,37
BLi00854	<i>yffF</i>	ähnlich zu unbekanntem Proteinen	0,36	-1,43

Tabelle 7.3: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen der Genregion um den ORF der Arginase. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit der angegebenen Aminosäure, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. n.b. - nicht bestimmt

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse		
			Arg / Glucose	Pro / Glucose	Orn / Glucose
BLi00418	<i>yckI</i>	ähnlich Glutamin ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	-1,08	0,85	0,83
BLi00419	<i>yckJ</i>	ähnlich Glutamin ABC-Transporter (Permease)	-1,55	0,36	0,81
BLi00420	<i>yckK</i>	ähnlich Glutamin ABC-Transporter (Glutaminbindendes Protein)	-1,19	0,94	0,25
BLi00421	<i>rocR</i>	transkriptionaler Aktivator des Argininverwertenden Operons	0,44	-0,16	n.b.
BLi00422	<i>rocD</i>	Ornithin-Aminotransferase	6,10	4,44	7,07
BLi00423	<i>rocE</i>	Aminosäurepermease	5,80	5,12	7,26
BLi00424	<i>rocF</i>	Arginase	5,29	4,87	6,58
BLi00425	<i>yclA</i>	ähnl. zu transkriptionalen Regulator (LysR Familie)	-0,41	0,10	0,15

<i>glnT</i>	1	ATGCAGCAATCCCTCAAGAAGTCATTGGTGTACAAAATGATTTCTTTGGTCAAAACTA	60
DSM13	247258	ATGCAGCAATCCCTCAAGAAGTCATTGGTGTACAAAATGATTTCTTTGGTCAAAACTA	247199
<i>glnT</i>	61	TTGATTATTATGCTTCTTGCTTCGGGACTGTTTTTACTTTTAAATCTAAGTCTTTCAA	120
DSM13	247198	TTGATTATTATGCTTCTTGCTTCGGGACTGTTTTTACTTTTAAATCTAAGTCTTTCAA	247139
<i>glnT</i>	121	GTTTCGCTTGCTGAAAGACATGTTCCGTGTTTTAAAGGAAGGAACGCCGACAAAACGGA	180
DSM13	247138	GTTTCGCTTGCTGAAAGACATGTTCCGTGTTTTAAAGGAAGGAACGCCGACAAAACGGA	247079
<i>glnT</i>	181	ATTTTCGCTTTTCAGGCTTTTGCATCAGCATGGCCGCGAGAGTAGGAACAGGAAATATT	240
DSM13	247078	ATTTTCGCTTTTCAGGCTTTTGCATCAGCATGGCCGCGAGAGTAGGAACAGGAAATATT	247019
<i>glnT</i>	241	ACGGGGATTGCGATCGCCATTGCCTTGGGCGGACCCGGCGCTATCTTTTGGATGTGGATC	300
DSM13	247018	ACGGGGATTGCGATCGCCATTGCCTTGGGCGGACCCGGCGCTATCTTTTGGATGTGGATC	246959
<i>glnT</i>	301	ATCGCCATCATCGGTTCCGCGTCAAGCTTTGTGCGAAAGCAGCTGGCGCAAATTTATAAA	360
DSM13	246958	ATCGCCATCATCGGTTCCGCGTCAAGCTTTGTGCGAAAGCAGCTGGCGCAAATTTATAAA	246899
<i>glnT</i>	361	ATAAAGGATAAAGACGGCTTCCGCGCGCCCTGCTTACTATATGAAAAGGGCTTGAAA	420
DSM13	246898	ATAAAGGATAAAGACGGCTTCCGCGCGCCCTGCTTACTATATGAAAAGGGCTTGAAA	246839
<i>glnT</i>	421	AAACGCTGGATGGGCGCGGTTTTTGCCGCTTGATCACATTGTCCTTCGGGATCGTTTTT	480
DSM13	246838	AAACGCTGGATGGGCGCGGTTTTTGCCGCTTGATCACATTGTCCTTCGGGATCGTTTTT	246779
<i>glnT</i>	481	AACGCGTCCAGTCCAATACAATAACGGTCCGTTTTGAAAACCGTTCGGGACAGACCGT	540
DSM13	246778	AACGCGTCCAGTCCAATACAATAACGGTCCGTTTTGAAAACCGTTCGGGACAGACCGT	246719
<i>glnT</i>	541	CTCACACTGGGAATTATCATCACGATTGTTTTCGGCATCATACATTTCGGGGGAATCAA	600
DSM13	246718	CTCACACTGGGAATTATCATCACGATTGTTTTCGGCATCATACATTTCGGGGGAATCAA	246659
<i>glnT</i>	601	CGGATCGCCAAGCTGTCCGAATATATCGTCGTATGCCTGGCCGCTTATATATCGGCGTC	660
DSM13	246658	CGGATCGCCAAGCTGTCCGAATATATCGTCGTATGCCTGGCCGCTTATATATCGGCGTC	246599
<i>glnT</i>	661	GCCGTTTTTCGTCATGCTGATGAATATTACGAAACTGCCCGACGCTCATCTCTTTGATTATC	720
DSM13	246598	GCCGTTTTTCGTCATGCTGATGAATATTACGAAACTGCCCGACGCTCATCTCTTTGATTATC	246539
<i>glnT</i>	721	GGTCATGCGTTTTGSCCTTGAACAAGCGGCGGGGAGCCATCGGCGCGCCCTGATGAAC	780
DSM13	246538	GGTCATGCGTTTTGSCCTTGAACAAGCGGCGGGGAGCCATCGGCGCGCCCTGATGAAC	246479
<i>glnT</i>	781	GGGATCAAACCGGCTCTTCTCGAATGAAGCCGGATGGGAGCGCGCGAATGCCGCA	840
DSM13	246478	GGGATCAAACCGGCTCTTCTCGAATGAAGCCGGATGGGAGCGCGCGAATGCCGCA	246419
<i>glnT</i>	841	GCCGAGCCACTACGAGCCACCCTGTCAAACAGGGCCTTGTCCAGGCTTTAGGAGTCTTT	900
DSM13	246418	GCCGAGCCACTACGAGCCACCCTGTCAAACAGGGCCTTGTCCAGGCTTTAGGAGTCTTT	246359
<i>glnT</i>	901	ACGAGCACTTTGGTGATTTGTTCAAGCACGGCTTTTATCATTTTGTTTTCCGATCGGTAT	960
DSM13	246358	ACGAGCACTTTGGTGATTTGTTCAAGCACGGCTTTTATCATTTTGTTTTCCGATCGGTAT	246299
<i>glnT</i>	961	AAAGAGCCGGGCTTAGCGGAATCGAGTTGACGCAAGCGTCGCTCAGCAGCACATCGGA	1020
DSM13	246298	AAAGAGCCGGGCTTAGCGGAATCGAGTTGACGCAAGCGTCGCTCAGCAGCACATCGGA	246239
<i>glnT</i>	1021	GCATGGGCTCAGGCTTTCTCGCCATTATGGTGTTCCTGTTTTCTTTTCAGCACCTTGATC	1080
DSM13	246238	GCATGGGCTCAGGCTTTCTCGCCATTATGGTGTTCCTGTTTTCTTTTCAGCACCTTGATC	246179
<i>glnT</i>	1081	GGAAACTACTACTACGGGAGACGAATATCGAATTCCTGCACACGAACAAAGCATGGCTC	1140
DSM13	246178	GGAAACTACTACTACGGGAGACGAATATCGAATTCCTGCACACGAACAAAGCATGGCTC	246119
<i>glnT</i>	1141	TTTATTTACCGGATCTGTGCTTGCATGGTTCATCTTCGGATCGGTATCAAAGTCCAG	1200
DSM13	246118	TTTATTTACCGGATCTGTGCTTGCATGGTTCATCTTCGGATCGGTATCAAAGTCCAG	246059
<i>glnT</i>	1201	CTTGTGTGGACCTCGCGATTGTTTCATGGGCTGATGGTTCATCGTCAACCTGATTGCG	1260
DSM13	246058	CTTGTGTGGACCTCGCGATTGTTTCATGGGCTGATGGTTCATCGTCAACCTGATTGCG	245999
<i>glnT</i>	1261	ATTTTCCTGCTGTCAAAGTGGCATTGCGCCCTTGAAAGACTATGTGAAACAGCGCAA	1320
DSM13	245998	ATTTTCCTGCTGTCAAAGTGGCATTGCGCCCTTGAAAGACTATGTGAAACAGCGCAA	245939
<i>glnT</i>	1321	GCGGGCAAAGACCCGGTCTTTTATAAGATGTCATTAATAAACCATGAAGGCATCGAATGC	1380
DSM13	245938	GCGGGCAAAGACCCGGTCTTTTATAAGATGTCATTAATAAACCATGAAGGCATCGAATGC	245879
<i>glnT</i>	1381	TGGGAGCACTCCGGCACCAGCAAAAAATCCGAAAGCAAAAAATGCGATATAA	1431
DSM13	245878	TGGGAGCACTCCGGCACCAGCAAAAAATCCGAAAGCAAAAAATGCGATATAA	245828

Abbildung 7.1: Ergebnis des Vergleichs mittels BLAST von der DNA Sequenz von *glnT* (Rey et al., 2004) und DSM13 (Veith et al., 2004).

Tabelle 7.4: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen der Genregion der am Abbau von L-Prolin beteiligten ORFs. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit der angegebenen Aminosäure im Vergleich zur Kultivierung unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse		
			Arg / Glucose	Pro / Glucose	Orn / Glucose
BLi00372	<i>ycgL</i>	YcgL	0,83	0,87	1,20
BLi00373	<i>ycgM</i>	ähnlich zur Prolin-Oxidase	3,44	3,78	5,01
BLi00374	<i>ycgN</i>	ähnlich zur Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat- Dehydrogenase	3,95	3,57	5,16
BLi00375	<i>ycgO</i>	ähnl. zur Prolin-Permease	2,99	5,66	5,01
BLi00376	<i>ycgP</i>	YcgP	2,20	3,55	1,22

Tabelle 7.5: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen beim Wachstum mit L-Asparagin bzw. L-Aspartat. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit der angegebenen Aminosäure im Vergleich zur Kultivierung unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse	
			Asn / Glucose	Asp / Glucose
BLi00227		putative Carboxylase	3,75	2,43
BLi01010	<i>citA</i>	Citrat-Synthase I	6,49	4,05
BLi04137	<i>mleA</i>	mögl. Malolactisches Enzym	4,72	3,94
BLi04138	<i>mleN</i>	Malat-H ⁺ /Na ⁺ -Lactat Antiporter	4,32	3,47
BLi04139		homolog zur AnsB L- Aspartase	4,67	3,65
BLi04140	<i>ansA</i>	L-Asparaginase	5,55	4,67
BLi04141	<i>ansR</i>	transkriptionaler Repressor des <i>ansAB</i> Operons	3,00	3,23
BLi04214	<i>bglH</i>	β -Glucosidase	2,41	1,61

Tabelle 7.6: Vergleichende Darstellung von Expressionsverhältnissen beim Wachstum mit Aminosäuren bzw. Gluconat. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit der angegebenen Aminosäure bzw. Gluconat, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. Gluc - Gluconat

ID	Gen	Annotation	log. Expressionsverhältnisse											
			Ala / Glc	Arg / Glc	Asn / Glc	Asp / Glc	Gln / Glc	Glu / Glc	Pro / Glc	Glu / Glc	Asn / Glc	Asp / Glc	Gln / Glc	Glu / Glc
BLi00853	<i>acoR</i>	transkript. Aktivator des Acetoin-Dehydrogenase Operon	2,99	2,47	2,72	2,32	2,27	3,63	2,60	0,82				
BLi01143	<i>melA</i>	α -D-Galaktosid-Galaktohydrolase	2,80	2,36	1,63	1,83	2,90	3,06	2,04	0,83				
BLi02102		putative Enoyl(3-hydroxyisobutyryl)-Coenzyme A Hydratase Protein	2,74	4,15	2,56	2,04	3,39	3,57	2,67	0,80				
BLi02103		putative Enoyl-CoA Hydratase	2,89	4,21	2,48	1,92	3,44	3,64	2,69	0,82				
BLi02104	<i>mmsA</i>	Methylmalonat-Semialdehyd Dehydrogenase	2,56	3,64	2,38	1,81	2,74	3,72	2,86	0,84				
BLi02105		putative 2-Hydroxy-3-Oxopropionat Reductase	3,32	4,40	3,32	2,32	3,61	4,28	3,01	0,24				
BLi02106		putative Butyryl-CoA Dehydrogenase	3,14	4,27	2,50	2,00	3,53	4,40	2,43	0,21				
BLi03498		putative Pectin Methylsterase	3,28	3,25	2,68	2,04	3,82	4,09	2,55	0,60				
BLi04275		homolog zu Ald: L-Alanin Dehydrogenase	7,41	6,28	8,37	2,72	3,42	2,11	3,57	-1,47				

Tabelle 7.7: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des bioinformatischen Softwaretools *BiBag* bei einem gesetzten Schwellenwert der Sequenzähnlichkeit von 75%. put. - putativ

ID	Annotation	Sequenzähnlichkeit (%)	
		<i>Bacillus weihen-</i> <i>stephanensis</i> KBAB4	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
BLi00198	homolog zur RocF Arginase	82,2	82,2
BLi00245	putativer Natriumabhängiger Phosphattransporter	82,4	82,8
BLi00326	put. Cellobiose Phosphotransferase System Enzym II	78,1	78,1
BLi00327	hypothetisches Protein	76,4	77,5
BLi00528	L-Aspartase	87,1	86
BLi00536	put. H ⁺ /Glutamat Symport Protein	75,4	76,1
BLi00656	α-Amylase Vorläufer	80,7	81,1
BLi00740	hypothetisches Protein	76,7	76
BLi00753	putative Methyltransferase	76	76,1
BLi00875	hypothetisches Protein	76,5	76,5
BLi00972	putatives ABC Transporter ATP-bindendes Protein	80	79,7
BLi01050	kleines säure-lösliches Sporenprotein	86,6	85,5
BLi01192	putative 5-Methyltetrahydrofolat- Homocystein-Methyltransferase	77,8	78,5
BLi01213	putative Undecaprenol-Kinase	81,5	81,5
BLi01777	hypothetisches Protein	76,6	76,6
BLi02012	putative Acetyltransferase	82,8	81,7
BLi02013	hypothetisches Protein	76,3	79,7
BLi02055	konserviert hypothetisches Protein	79,1	79,1
BLi02102	put. Enoyl(3-hydroxyisobutyryl)- Coenzyme A-Hydratase	78,8	78,8
BLi02104	Methylmalonat-Semialdehyd-DH	88,9	88,9

BLi02105	putative 2-Hydroxy-3-Oxopropionat-Reductase	80,1	79,1
BLi02106	putative Butyryl-CoA-Dehydrogenase	79,1	79,2
BLi02114	put. transkriptionaler Regulator	75	75
BLi02131	putatives Aktivierungsenzym der Pyruvat-Formiat-Lyase	77,9	78,3
BLi02132	putative Formiat-Acetyltransferase	88,3	88,3
BLi02328	putative Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase	77	79,8
BLi02797	konserviert hypothetisches Protein	88,1	88,5
BLi02810	ähnlich zur Thioredoxin-Reduktase	86,2	85,1
BLi02927	put. transkriptionaler Regulator	88,8	88,8
BLi02962	putative verzweigt-kettige Aminosäure-Aminotransferase	81,2	81,6
BLi03657	putatives Eisen(III)-Transporter-Bindungsprotein	75,5	75,5
BLi03823	Aktivierungsenzym putative anaerobe Ribonukleotidreduktase	67,4	68
BLi03824	putative anaerobe Ribonukleotidreduktase	82,1	80,9
BLi03966	Acyl-CoA-Dehydrogenase	77,7	76,4
BLi04097	put. Chromat-Transportprotein	78,4	78,6
BLi04207	putative Isocitrat-Lyase	90,4	90,4
BLi04208	putative Malat-Synthase	79,6	79
BLi04269	konserviert hypothetisches Protein	84,8	85,2
BLi04275	homolog zu Ald: L-Alanin-Dehydrogenase	84,4	84,9
BLi04290	putative Alkohol-Dehydrogenase / Acetaldehyd-Dehydrogenase	84,2	84

Tabelle 7.8: Expressionsverhältnisse von ORFs der Phagenbereiche. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren zu den angegebenen Zeitpunkten, Werte kleiner -1 eine verstärkte Expression unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen. In diesem Fall wurden die englischsprachigen Bezeichnungen der Annotation beibehalten. Die Phagenbereiche sind optisch getrennt. n.b. – nicht bestimmt

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnisse				
			T1 / Glc	T2 / Glc	T3 / Glc	T4 / Glc	T5 / Glc
BLi01314	none	none	0,09	-1,26	-0,91	-0,80	-2,35
BLi01315	<i>yeeF</i>	similar to unknown proteins from <i>B. subtilis</i>	-0,17	-1,60	-1,16	-1,11	-2,38
BLi01316	<i>yjqB</i>	similar to phage-related replication protein	n.b.	1,40	n.b.	0,80	0,88
BLi01317	<i>xkda</i>	PBSX prophage	-0,28	0,99	-0,15	-1,61	-2,32
BLi01318	<i>xre</i>	transcriptional repressor of PBSX genes	0,72	0,47	-0,94	-0,84	-1,78
BLi01319	none	putative repressor protein	n.b.	n.b.	1,74	n.b.	n.b.
BLi01320	none	none	1,86	0,87	n.b.	n.b.	-0,47
BLi01321	<i>xkdB</i>	PBSX prophage	n.b.	0,37	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01322	<i>xkdc</i>	PBSX prophage	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-0,19
BLi01323	none	none	2,13	1,28	3,09	-1,10	-2,03
BLi01324	<i>xkdD</i>	PBSX prophage	2,13	1,09	2,87	-1,02	-1,40
BLi01325	<i>xtrA</i>	PBSX prophage	1,72	0,99	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01326	<i>xpf</i>	RNA polymerase PBSX sigma factor-like	0,24	n.b.	n.b.	n.b.	0,11
BLi01327	<i>xtmA</i>	PBSX terminase (small subunit)	0,33	n.b.	1,88	-2,04	n.b.
BLi01328	<i>xtmB</i>	PBSX terminase (large subunit)	n.b.	0,25	1,90	-0,70	-1,50
BLi01329	<i>xkdE</i>	PBSX prophage	1,02	0,49	2,61	-1,96	-2,55
BLi01330	<i>xkdF</i>	PBSX prophage	1,56	0,18	2,17	-2,52	n.b.
BLi01331	<i>xkdG</i>	PBSX prophage	0,42	0,44	2,61	n.b.	n.b.
BLi01332	<i>yqbG</i>	unknown	1,06	0,28	2,56	-2,46	-3,64

BLi01333	<i>yqbH</i>	unknown; similar to phage-related protein	0,75	0,26	2,61	-2,54	n.b.
BLi01334	<i>xkdI</i>	PBSX prophage	0,59	0,21	2,41	-2,47	-3,01
BLi01335	<i>xkdJ</i>	PBSX prophage	1,17	0,27	2,53	-2,47	n.b.
BLi01336	none	none	1,49	0,40	2,71	-2,00	n.b.
BLi01337	<i>xkdK</i>	PBSX prophage	0,65	0,16	2,53	-2,87	n.b.
BLi01338	<i>xkdM</i>	PBSX prophage	0,51	0,55	2,71	-1,01	-2,48
BLi01339	<i>xkdN1</i>	PBSX prophage	0,58	-0,30	1,95	-3,29	n.b.
BLi01340	<i>xkdN2</i>	PBSX prophage	0,95	0,27	2,47	-3,02	-4,44
BLi01341	<i>xkdO</i>	PBSX prophage	0,73	0,01	2,41	-1,74	-2,32
BLi01342	<i>xkdP</i>	PBSX prophage	1,59	0,47	2,72	-2,01	-2,55
BLi01343	<i>yqbQ</i>	unknown; similar to phage-related protein	1,04	0,29	2,34	-1,79	-1,58
BLi01344	none	put. phage PBSX protein	0,96	0,63	2,80	-1,40	n.b.
BLi01345	<i>xkdS</i>	PBSX prophage	0,41	0,10	2,52	-2,94	-1,41
BLi01346	<i>yqbT</i>	unknown; similar to phage-related protein	1,02	-0,18	2,23	-1,91	-2,07
BLi01347	<i>xkdU</i>	PBSX prophage	n.b.	n.b.	1,20	n.b.	1,37
BLi01348	none	none	1,40	0,26	2,33	-1,97	-3,43
BLi01349	none	put. phage PBSX protein	0,99	0,03	2,21	-2,20	-3,01
BLi01350	none	put. phage PBSX protein	1,59	0,67	2,73	-1,80	-2,39
BLi01351	<i>xhIA</i>	involved in cell lysis upon induction of PBSX	1,11	0,15	2,53	-0,94	n.b.
BLi01352	none	put. cell wall hydrolase	1,46	0,42	1,86	-1,50	-1,80
BLi01427	none	none	0,60	1,00	0,52	-0,58	-1,73
BLi01428	none	putative integrase-phage associated	0,27	1,78	-0,02	-2,02	-2,84
BLi01429	<i>yqaB</i>	unknown; similar to phage-related protein	-0,56	0,83	-0,67	-2,06	-2,32
BLi01430	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-3,44
BLi01431	none	none	-0,05	-0,86	-0,38	-2,82	-3,77
BLi01432	none	none	0,48	-0,76	-0,89	-1,91	-3,87

BLi01433	<i>yqaE</i>	similar to transcriptional regulator (phage-related) (Xre family)	0,40	-0,47	-1,63	-1,59	-2,69
BLi01434	none	none	3,73	0,86	2,66	0,58	-2,34
BLi01435	none	none	n.b.	0,96	2,75	0,78	-1,95
BLi01436	none	putative phage protein	3,67	0,60	2,44	0,35	n.b.
BLi01437	none	putative phage protein	4,13	1,22	2,92	0,00	-2,05
BLi01438	<i>yqaH</i>	unknown	4,19	1,36	3,12	0,29	-2,11
BLi01439	none	none	4,33	1,53	3,10	0,79	n.b.
BLi01440	<i>yqaJ</i>	unknown; similar to phage-related protein	3,76	n.b.	2,49	-0,06	-1,71
BLi01441	<i>yqaK</i>	unknown; similar to phage-related protein	4,22	1,55	3,27	0,57	-0,91
BLi01442	<i>yqaL</i>	unknown	n.b.	1,14	2,69	0,30	-1,30
BLi01443	<i>yqaM</i>	unknown; similar to phage-related protein	3,78	0,73	2,33	0,28	-1,16
BLi01444	<i>yqaO</i>	unknown; similar to phage-related protein	3,72	0,85	2,41	0,17	-1,49
BLi01445	none	none	4,06	0,99	2,50	0,44	-1,39
BLi01446	none	none	3,98	1,01	2,63	0,55	-1,72
BLi01447	none	none	n.b.	1,50	2,53	0,54	-1,62
BLi01448	none	none	4,34	1,03	2,67	0,36	-1,67
BLi01449	none	none	3,95	0,97	2,48	0,22	-1,88
BLi01450	none	none	2,97	0,82	2,68	0,46	-1,42
BLi01451	none	none	n.b.	0,26	2,11	-0,50	-0,72
BLi01452	<i>yqaN</i>	unknown	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-1,31
BLi01453	none	putative single-stranded DNA-binding protein	4,16	1,17	3,31	0,33	-1,73
BLi01454	none	none	3,31	0,13	1,81	-0,34	0,29
BLi01455	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	1,43	1,95
BLi01456	none	none	3,59	1,13	2,85	1,74	2,07
BLi01458	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	1,43	n.b.

BLi01460	<i>yqaQ</i>	similar to unknown proteins from <i>B. subtilis</i>	n.b.	n.b.	3,25	1,65	0,19
BLi01461	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01462	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	1,01	n.b.
BLi01463	<i>yqaS</i>	similar to phage-related terminase small subunit	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01464	none	putative multidrug resistance protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01465	none	putative portal protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01466	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01467	none	none	n.b.	1,77	n.b.	n.b.	0,08
BLi01468	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	4,06	1,87	n.b.
BLi01469	none	none	4,05	3,34	5,02	2,84	-1,39
BLi01470	none	put. phage capsid protein	n.b.	2,93	4,26	2,91	n.b.
BLi01471	none	putative phage protein	2,81	2,96	4,29	1,97	-0,17
BLi01472	none	none	1,88	1,94	3,04	2,06	0,41
BLi01473	none	putative phage protein	n.b.	3,05	n.b.	2,03	n.b.
BLi01474	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	0,73	0,77
BLi01475	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	1,25	n.b.
BLi01476	none	putative phage tail protein	3,59	n.b.	3,61	2,00	-0,22
BLi01477	none	putative phage tail protein	3,64	2,43	3,48	2,58	0,72
BLi01478	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01479	none	putative phage protein	1,43	1,61	2,90	1,23	n.b.
BLi01480	none	putative phage protein	2,85	n.b.	3,24	0,91	n.b.
BLi01481	none	none	n.b.	1,97	3,09	1,14	-0,30
BLi01482	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	1,00	n.b.
BLi01483	none	none	n.b.	2,56	n.b.	2,61	n.b.
BLi01484	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	1,92	n.b.
BLi01485	<i>xhlB</i>	hydrolysis of 5-bromo 4-chloroindolyl phosphate upon induction of PBSX	3,18	n.b.	n.b.	1,60	-0,36
BLi01486	none	putative glycosyl hydrolase/lysozyme	n.b.	1,46	n.b.	0,44	n.b.

BLi01540	none	none	n.b.	-0,31	n.b.	0,31	0,07
BLi01542	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-0,23
BLi01543	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01544	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01545	none	none	n.b.	0,41	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01546	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	-0,55	0,14
BLi01547	none	putative terminase-small subunit	0,33	n.b.	n.b.	-0,01	-0,18
BLi01548	none	putative terminase	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01549	none	putative phage head portal protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01550	none	put. phage pi3 protein 23, ATP dependent Clp protease	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01551	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01552	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01553	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01554	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,30
BLi01555	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01556	none	putative phage tail protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01557	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01558	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01559	<i>yqbO</i>	unknown; similar to phage-related protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01560	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01561	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01562	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01563	<i>pBSX</i>	prophage ORF xkdV	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01564	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	-0,30	0,00
BLi01565	<i>yomP</i>	unknown; similar to phage-related protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-0,14
BLi01566	none	put. phosphodiesterase	-1,45	-0,82	-1,77	-1,56	-1,88
BLi01567	<i>bhIA</i>	holin-like protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

BLi01568	<i>xlyB</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (PBSX prophage-mediated lysis)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01569	none	putative holin	1,59	0,22	-0,22	-1,98	-2,59
BLi01570	none	none	0,56	-0,37	-0,46	1,07	-2,78
BLi01571	none	none	-0,27	1,10	0,33	1,07	0,70
BLi01572	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi01573	none	none	0,40	4,50	0,85	1,17	0,82
BLi01574	none	putative integrase-phage associated	-0,50	2,21	-0,59	-0,35	0,36
BLi01575	none	none	0,38	1,47	-0,30	-0,78	-1,05
BLi03598	<i>blyA</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase cwIL precursor (EC 3.5.1.28) (Cell wall hydrolase) (Autolysin)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,47
BLi03599	none	putative phage protein	0,86	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03600	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03601	yomQ	unknown	-0,30	0,57	0,95	1,82	1,19
BLi03602	none	put. phage PBSX protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03603	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03604	none	putative phage autolysin (amidase) homolog	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03605	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03606	none	putative phage tail protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03607	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03608	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03609	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03610	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03611	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03612	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,35
BLi03613	none	none	n.b.	n.b.	-1,04	-0,52	0,74
BLi03614	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

BLi03615	<i>clpP</i>	family serine protease, possible phage related	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,69
BLi03616	none	putative portal protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03617	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03618	none	putative terminase, large subunit	n.b.	n.b.	1,05	n.b.	0,80
BLi03619	none	putative phage terminase protein, small subunit	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03620	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03622	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	1,45	n.b.
BLi03623	none	none	0,70	n.b.	n.b.	0,52	0,09
BLi03624	none	putative phage protein	-0,13	-0,18	0,19	-0,02	0,14
BLi03626	none	putative phage protein	n.b.	0,00	n.b.	-0,14	0,12
BLi03627	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	-0,15	-0,12
BLi03628	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	-0,29	0,43
BLi03629	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	-0,32	0,06
BLi03630	none	putative phage protein	n.b.	0,91	1,13	1,48	1,13
BLi03631	none	putative phage protein	2,52	n.b.	1,31	0,46	0,63
BLi03632	none	putative phage protein	2,51	1,36	1,22	0,62	1,65
BLi03633	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03634	none	none	n.b.	1,31	1,16	0,65	1,42
BLi03635	none	putative phage protein	0,39	0,57	0,91	1,50	0,26
BLi03636	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
BLi03637	none	putative phage protein	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,21
BLi03638	none	none	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 7.9: Übersicht von Genen, welche beim Wachstum mit proteinogenen Aminosäuren eine erhöhte Expression zeigten. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit L-Ornithin im Vergleich zur Kultivierung unter der Referenzbedingung.

ID	Gen	Funktion	log Expressionsverhältnis L-Ornithin / Glucose
BLi00853	<i>acoR</i>	transkriptionaler Aktivator des Acetoin-Dehydrogenase Operons	1,54
BLi01143	<i>melA</i>	α -D-Galaktosid-Galaktohydrolase	1,00
BLi02102		putative Enoyl(3-hydroxyisobutyryl)- Coenzyme A Hydratase Protein	2,70
BLi02103		putative Enoyl-CoA Hydratase	2,02
BLi02104	<i>mmsA</i>	Methylmalonat-Semialdehyd Dehydrogenase	2,43
BLi02105		putative 2-Hydroxy-3-Oxopropionat Reductase	1,85
BLi02106		putative Butyryl-CoA-Dehydrogenase	2,45
BLi03498		putative Pectin-Methylesterase	1,41
BLi04275		homolog zur Ald: L-Alanin- Dehydrogenase	5,09

Tabelle 7.10: Vergleichende Darstellung der via PCR-basierenden bzw. Oligo-basierenden DNA-Microarrays ermittelten Expressionsverhältnisse. Abgebildet sind Expressionswerte beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol (2,3-B.) im Vergleich zum Wachstum mit Glucose. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit Acetat bzw. 2,3-Butandiol im Vergleich zur Kultivierung unter der Referenzbedingung. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

n.b. - nicht bestimmt

ID	Gen	Funktion	log Expressionsverhältnisse			
			PCR-Chip ¹⁾		Oligo-Chip ²⁾	
			Acetat / Glc	2,3-B. / Glc	Acetat / Glc	2,3-B. / Glc
BLi00849	<i>acoA</i>	Acetoin-Dehydrogenase (TPP-abhängige α -Untereinheit)	2,68	8,11	4,66	8,14
BLi00850	<i>acoB</i>	Acetoin-Dehydrogenase (TPP-abhängige β -Untereinheit)	4,08	7,49	4,80	8,64
BLi00851	<i>acoC</i>	Acetoin-Dehydrogenase (Dihydrolipoamid- Acetyltransferase)	2,59	7,66	3,54	7,99
BLi00852	<i>acoL</i>	Acetoin-Dehydrogenase (Dihydrolipoamid- Dehydrogenase)	n.b.	4,26	3,86	7,83
BLi00853	<i>acoR</i>	transkript. Aktivator des <i>aco</i> -Operons	n.b.	2,92	2,58	4,37
BLi02047	<i>citB</i>	Aconitat-Hydratase	1,26	0,58	2,00	2,27
BLi03119	<i>acsA</i>	Acetyl-CoA-Synthetase	4,11	3,56	3,90	3,76
BLi03197	<i>pckA</i>	PEP-Carboxykinase	5,77	4,07	6,43	6,04
BLi04207		Isocitrat-Lyase	6,78	6,73	6,83	7,33
BLi04208		Malat-Synthase	7,01	7,24	7,32	8,07

¹⁾ Veith, 2004

²⁾ repräsentative Einzelmessungen

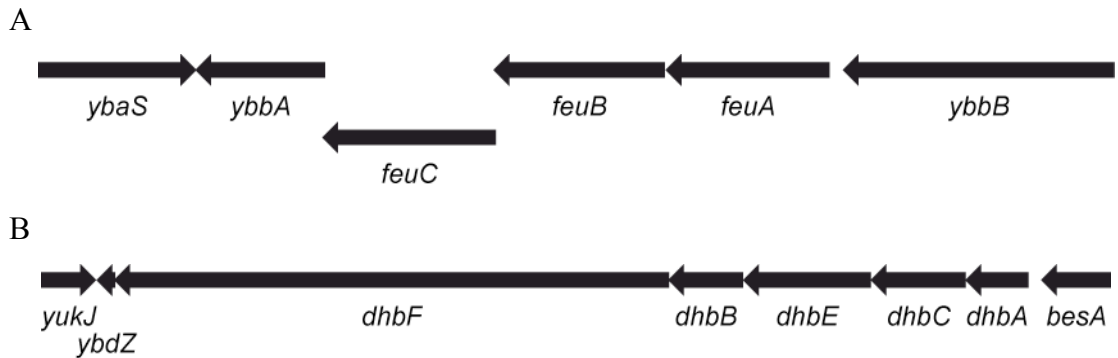


Abbildung 7.2: Darstellung der an der Biosynthese und Transport von Bacillibactin beteiligter feu- (A) und dhb-Regionen (B) bzw. angrenzender Gene in *B. subtilis*. Die Relationen der Genomabschnitte sind nicht in Relation zueinander dargestellt. Der Genomabschnitt in A hat eine Größe von etwa 6,5 kb und der Genomabschnitt in B eine Größe von etwa 14 kb.

A *ybaS*, putativer natriumabhängiger Transporter; *ybbA*, putative Eisen-Chelat-Esterase; *feuC*, Eisenaufnahmeprotein; *feuB*, Eisenaufnahmeprotein; *feuA*, Eisen-Hydroxamatbindendes Protein; *ybbB*, putativer transkriptionaler Regulator; **B** *yukJ*, hypothetisches Protein; *ybdZ*, hypothetisches Protein; *dhbF*, Siderophor 2,3-Dihydroxybenzoat-Glycin-Threonin Trimere-Ester-Bacillibactin-Synthetase; *dhbB*, Isochorismatase; *dhbE*, 2,3-Dihydroxybenzoat-AMP-Ligase; *dhbC*, Isochorismat-Synthase; *dhbA*, 2,3-Dihydroxybenzoat-2,3-Dehydrogenase; *besA*, Bacillibactin-Trilacton-Hydrolase

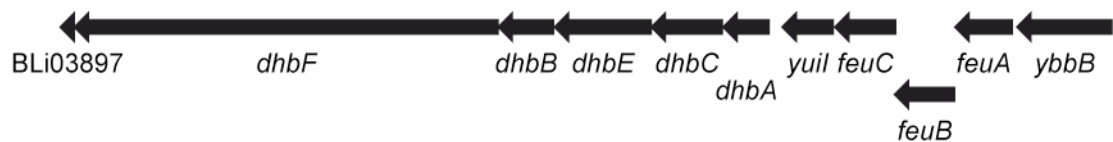


Abbildung 7.3: Anordnung von Genen, welche mit der möglichen Biosynthese von Bacillibactin in *B. licheniformis* im Zusammenhang stehen. *BLi03897*, hypothetisches Protein; *dhbF*, putative Siderophor 2,3-Dihydroxybenzoat-Glycin-Threonin Trimere-Ester-Bacillibactin-Synthetase; *dhbB*, Isochorismatase; *dhbE*, 2,3-Dihydroxybenzoat-AMP-Ligase; *dhbC*, Isochorismat-Synthase; *dhbA*, 2,3-Dihydroxybenzoat-2,3-Dehydrogenase; *yuiI*, YuiI; *feuC*, Eisenaufnahmesystem (Membranprotein); *feuB*, Eisenaufnahmesystem (Membranprotein); *feuA*, Eisenaufnahmesystem (bindendes Protein); *ybbB*, ähnlich transkriptionaler Regulator



Abbildung 7.4: Darstellung des *mmg*-Operons in *B. subtilis*. Die Gene des Fettsäuremetabolismus sind zusammen mit den Genen des Methylcitratzyklus in einem Operon organisiert. *prpB*, 2-Methylisocitrat-Lyase; *prpD*, 2-Methylcitrat-Dehydratase; *mmgD*, Citratsynthase III; *mmgC*, Acyl-CoA-Dehydrogenase; *mmgB*, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; *mmgA*, Acetoacetyl-CoA-Thiolase

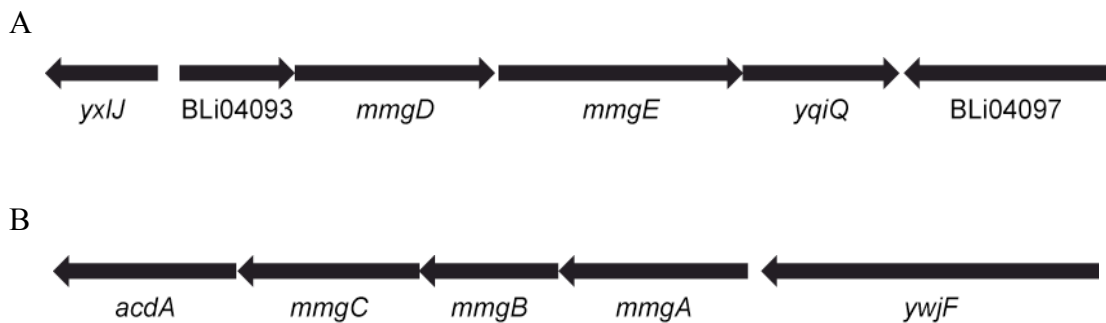


Abbildung 7.5: Vergleichende Darstellung der Genregionen des putativen Methylcitratzyklus (A) und *mmgABC* (B) für *B. licheniformis* DSM13. **A** *yxjJ*, ähnlich zu DNA-3-Methyladenin-Glycosidase; BLi04093, putativer transkriptionaler Regulator; *mmgD*, Citratsynthase III / putative Methylcitratsynthase; *mmgE*, 2-Methylcitrat-Dehydratase; *yqiQ*, putative Methylisocitrat-Lyase; BLi04097, putatives Chromatransportprotein; **B** *acdA*, Acyl-CoA-Dehydrogenase; *mmgC*, Acyl-CoA-Dehydrogenase; *mmgB*, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; *mmgA*, Acetyl-CoA-Acetyltransferase; *ywjF*, ähnlich zu Eisen-Schwefel-bindenden Reduktasen

Tabelle 7.11: Übersicht von Expressionsverhältnissen von Genen des Tricarbonsäurezyklus. Werte größer 1 bedeuten eine verstärkte Expression beim Wachstum mit L-Asparagin im Vergleich zur Kultivierung unter der Referenzbedingung. Mit einem Stern gekennzeichnete Werte konnten in einem zweiten biologischen Experiment nicht reproduziert werden. Die Tabelle enthält repräsentative Einzelmessungen.

ID	Gen	Funktion	log Expressionsverhältnis L-Asparagin / Glucose
BLi01010	<i>citA</i>	Citratsynthase I	6,49
BLi01677	<i>pdhD</i>	Pyruvat-Dehydrogenase / 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase E3-Untereinheit	2,09
BLi01829	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Synthetase (β -Untereinheit)	1,95*
BLi01830	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA-Synthetase (α -Untereinheit)	1,69
BLi02047	<i>citB</i>	Aconitat-Hydratase	-0,59
BLi02259	<i>odhB</i>	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (E2 Untereinheit)	1,19
BLi02260	<i>odhA</i>	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (E1 Untereinheit)	-0,19
BLi02992	<i>sdhB</i>	Succinat-Dehydrogenase (Eisen- Schwefelprotein)	1,18
BLi02993	<i>sdhA</i>	Succinat-Dehydrogenase (Flavoprotein-Untereinheit)	0,45
BLi02994	<i>sdhC</i>	Succinat-Dehydrogenase (Cytochrom b558-Untereinheit)	0,47
BLi03060	<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase	0,94
BLi03061	<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	0,66
BLi03062	<i>citZ</i>	Citratsynthase II	0,96
BLi03197	<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	6,66
BLi03486	<i>citG</i>	Fumarat-Hydratase	0,64
BLi04094	<i>mmgD</i>	Citratsynthase III	0,25

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich nun die Gelegenheit nutzen, um an einige Personen meinen Dank zu richten. Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Liebl für die Ermöglichung des selbständigen Arbeitens und im Weiteren für die Übernahme des Referats bedanken. Ein sehr großer Dank richtet sich an Dr. Armin Ehrenreich für die Überlassung dieses Themas, seiner Diskussionsbereitschaft und seines Ideenreichtums. Vielen Dank für die Gelegenheit, auch mal über den „Tellerrand“ hinausschauen zu können.

Herrn PD. Dr. R. Daniel danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich möchte ebenfalls die Gelegenheit nutzen und mich bei unseren Kooperationspartnern der Firma Henkel, Prof. Maurer, Dr. Bongaerts und Herrn Evers, für die Zusammenarbeit zu bedanken.

Ein besonderes Dankeschön richtet sich an Anja und Désirée für die freundliche Aufnahme in Freising. Es war eine Erfahrung wert. Darüber hinaus möchte ich aber nicht die weiteren jetzigen und früheren Mitglieder der Arbeitsgruppe vergessen. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit. Es war schön mit Euch, sowohl in Göttingen, als auch in Freising. Im Weiteren möchte ich mich bei Antje und Hedwig bedanken, welche mir durch ihre Einführungen in die Programmiersprachen sehr weitergeholfen haben. Nicht zu vergessen Christina, welche immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich bin Dir zu großem Dank verpflichtet.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für Ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Ein Dankeschön richtet sich ebenso an meine Schwester samt Familie, ebenso wie an meine Schwiegereltern, meinen Schwager und Schwägerin, welche mich nicht nur während meines Studiums, sondern auch darüber hinaus in meinem Tun bestärkt haben.

Mein größter Dank gebührt aber den drei wichtigsten Personen in meinem Leben, meiner Frau Tanja und meinen Töchtern Lea Marie und Pia Sophie. Vielen Dank für Eure Liebe, Zuneigung und Euer Verständnis.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 08. Juni 1976
Geburtsort Langenhagen
Familienstand verheiratet, zwei Kinder (10 und 3 Jahre alt)
Nationalität deutsch

Naturwissenschaftliche Ausbildung

03/2009 – heute **Arbeiten zur Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München**

Lehrstuhl Prof. W. Liebl, Arbeitsgruppe Dr. A. Ehrenreich

06/2006 – 02/2009 **Arbeiten zur Anfertigung der Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen**

Lehrstuhl Prof. W. Liebl, Arbeitsgruppe Dr. A. Ehrenreich

12/2005 – 05/2006 **Wiss. Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie und Genetik Göttingen**

Lehrstuhl Prof. W. Liebl, Arbeitsgruppe Dr. A. Ehrenreich

10/1997 – 10/2005 **Studium der Naturwissenschaften an der Georg-August-Universität Göttingen**

Prüfungsfächer : Mikrobiologie, Immunologie, Betriebswirtschaftslehre

(Schwerpunkt Handelsbetriebslehre)

Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zum anaeroben fermentativen Wachstum

von *Bacillus licheniformis* DSM13

Hochschulgrad Diplom-Biologe, Gesamtnote: Gut

Wehrdienst

09/1996 – 06/1997 Grundwehrdienst in Breitenburg und Wildeshausen

Schulabschluss

21.05.1996 Matthias-Claudius-Gymnasium Gehrden
Allgemeine Hochschulreife, Abiturnote: 3,0

Weiterbildung

25. – 26.09.2007 Dionex GmbH, Ionenchromatographie – Fortgeschrittenenkurs

Hannover, den 08. Juni 2010