

Funktionelle Analyse RNA-basierter
Regulation des zentralen
Energiestoffwechsels in *Bacillus*
licheniformis

Dissertation

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

im Promotionsprogramm Biologie
der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von
Robert Hertel
aus Abaj

Göttingen 2015

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Rolf Daniel, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

PD Dr. Michael Hoppert, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Dr. Heiko Liesegang, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. Rolf Daniel, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Korreferent: PD Dr. Michael Hoppert, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Jörg Stülke, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Prof. Dr. Heinz Neumann, Abteilung für Angewandte und Synthetische Biologie, Institut für Molekulare Strukturbiologie

Prof. Dr. Kai Heimel, Abteilung für Mikrobielle Zellbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Dr. Oliver Valerius, Abteilung für Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2015

Danksagung

Nun ist es soweit. Mit dieser Arbeit erfüllt sich mein Kindheitstraum vom Wissenschaftler sein. Der Weg vom Beginn des Studiums bis zu diesem Manuskript war lang und doch verlief alles irgendwie schnell. Auf diesem Weg sind mir die unterschiedlichsten Menschen begegnet. Persönlichkeiten, die mich inspirierten, provozierten, anspornten, forderten und förderten. An dieser Stelle möchte ich mich bei all diesen Menschen bedanken. Danke an die Kommilitonen, Kollegen, Freunde und die Familie. Danke, dass ihr mich auf diesem für mich sehr wichtigen und besonderen Abschnitt meines Lebens begleitet habt.

Im Besonderen möchte ich Professor Dr. Rolf Daniel und Dr. Heiko Liesegang für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit danken. Meinen direkten Betreuern Professor Dr. Rolf Daniel, Dr. Heiko Liesegang, Dr. Michael Hoppert und Dr. Sonja Volland danke ich für die kompetente Begleitung dieser Arbeit und ihre Freundschaft, die mir über so manche Tiefen hinweg half. Ein Dank auch an die Prüfungskommission für die Evaluation meiner Arbeit und die Teilnahme an meiner Disputation.

Meiner Frau Katarina möchte ich den größten Dank aussprechen. Ohne sie, ihren Einsatz und ihren persönlichen Opfern, hätten wir parallel zu dieser Dissertation niemals das große Glück unserer drei Kinder, Gabriel, Richard und Mariana, genießen könnten.

Ein Dank auch an das Studentenwerk Göttingen, das unserer Familie in dieser spannenden Zeit ein gutes und sicheres Heim gegeben hat.

Danke

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Bacillus</i>	1
1.2	<i>Bacillus licheniformis</i>	2
1.3	Phagen	4
1.4	Genetische Zugänglichkeit von <i>Bacillus</i> Stämmen	6
1.5	RNA-Regulatoren	7
1.6	Ziele der Arbeit	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Organismen und Plasmide	12
2.2	Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien	14
2.3	Mikrobiologische Methoden	15
2.3.1	Sicherstellung der Keimfreiheit im Arbeitsmaterial	15
2.3.2	Verwendetes Wasser	15
2.3.3	Medienzusätze	15
2.3.4	Medien und Nährböden	16
2.3.5	Zellanzucht	22
2.3.6	Stammhaltung	22
2.3.7	Bestimmung der optischen Dichte	23
2.4	Molekularbiologische Methoden	23
2.4.1	Methoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren	23
2.4.2	Transformation von <i>Bacillus</i> und <i>E. coli</i>	30
2.4.3	Methoden zum Arbeiten mit Proteinen	34
2.4.4	DNA-DNA-Hybridisierung (<i>Southern Blot</i>)	37
2.4.5	RNA-RNA-Hybridisierung (<i>Northern Blot</i>)	42
2.4.6	Sequenzierung von DNA	50
2.5	Arbeiten mit Phagen	51
2.5.1	Isolation von Phagenpartikeln	51
2.6	Mikroskopie	52
2.6.1	Fluoreszenzmikroskopie	52
2.6.2	Transmissionselektronenmikroskopie	52
2.7	Bioinformatische Methoden	53
2.7.1	TraV	53

2.7.2	Vorhersage von Transkriptionsterminatoren.....	54
2.7.3	Überprüfung der RNA-Elemente auf proteinkodierende Bereiche..	54
2.7.4	Erstellung von Kovarianzmodellen.....	55
2.7.5	Darstellung der MLST-Phylogenie bei <i>B. licheniformis</i> -Stämmen .	56
2.7.6	Identifizierung von Prophagenregionen.....	57
2.7.7	Phylogenetische Klassifizierung von Prophagenregionen.....	58
3	Ergebnisse	60
3.1	Prophagen in <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	60
3.1.1	Prophagen im Genom von <i>B. licheniformis</i> DSM13	60
3.1.2	Klassifizierung der Prophagen	61
3.1.3	Erstellung von <i>B. licheniformis</i> Δ PBSX- Δ BLi_Pp3.....	62
3.1.4	Prophageninduktion mit Mitomycin C.....	63
3.1.5	Transmissionselektronenmikroskopie von Phagenpartikeln.....	65
3.1.6	Gelelektrophorese der gewonnenen Phagen-DNA	67
3.1.7	Genetischer Ursprung der isolierten Prophagen-DNA	68
3.2	<i>E. coli</i> / <i>Bacillus Shuttle</i> -Vektoren und Reporterplasmide.....	73
3.2.1	<i>E. coli</i> / <i>Bacillus Shuttle</i> -Vektoren pV1 und pV2	73
3.2.2	pV3SDlacZ und pV3lacZ.....	75
3.2.3	pV3Xg.....	82
3.2.4	pV3g.....	87
3.2.5	pV3Xb.....	88
3.2.6	pV3b.....	90
3.3	<i>Antisense</i> -sRNA AprAs.....	92
3.3.1	Erstellung der Mutante <i>B. licheniformis</i> MW3 AprAs ⁻	92
3.3.2	Proteasephänotyp von <i>B. licheniformis</i> MW3 AprAs ⁻	95
3.3.3	Komplementation von <i>B. licheniformis</i> MW AprAs ⁻	97
3.4	<i>Cis</i> -regulatorische RNA-Elemente in <i>B. licheniformis</i> DSM13	100
3.4.1	Sortierkriterien für <i>cis</i> -regulatorische RNA-Elemente	100
3.4.2	Strukturverwandte Elemente identifizierter Kandidaten für <i>cis</i> -regulatorische RNAs	104
3.4.3	Verteilung von BLi_r2291 in der <i>B. licheniformis</i> -Gruppe.....	110
3.4.4	Experimentelle Überprüfung der Promotoraktivität der Kandidaten BLi_r0736 und BLi_r2066.....	113
4	Diskussion	115

4.1	Prophagen in <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	115
4.1.1	Sieben Prophagen im Genom von <i>B. licheniformis</i> DSM13	115
4.1.2	Partikelbildende Prophagen	117
4.1.3	Der PBSX-ähnliche Prophage BLi_Pp2	119
4.2	Vektoren zur Verwendung in <i>B. licheniformis</i>	122
4.2.1	pV2 <i>Shuttle</i> -Vektor-System	122
4.2.2	Reporterplasmide auf der Grundlage von pV2	124
4.3	<i>Antisense</i> -RNA AprAs	127
4.3.1	Exoprotease-Phänotyp der AprAs ⁻ Mutante.....	127
4.3.2	Komplementation der AprAs ⁻ Mutante.....	128
4.3.3	<i>apr</i> und <i>aprAs</i>	129
4.4	<i>Cis</i> -regulatorische RNA-Elemente in <i>B. licheniformis</i> DSM13	132
4.4.1	Sortierung identifizierter RNA-Elemente	132
4.4.2	Weiteres Potential für regulatorischer RNA-Elemente.....	134
4.4.3	Kovarianzmodelle	136
4.4.4	Experimentelle Überprüfung einzelner Kandidaten.....	138
5	Zusammenfassung.....	142
6	Ausblick.....	143
7	Quellen	144
8	Anhang	161
8.1	Ergänzendes Material	161
8.2	Oligonukleotide	173
	Lebenslauf.....	175
	Publikationsverzeichnis	176
	Wissenschaftliche Artikel	176
	Posterpräsentationen	176
	Selbständigkeitserklärung.....	177

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ligasefreie Erstellung von DNA-Konstrukten	29
Abbildung 2: Schema der Erstellung eines pKVM-Deletionsvektors	34
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Elektroblobs	47
Abbildung 4: <i>Southern Blot</i> potentieller <i>B. licheniformis</i> Δ PBSX- Δ BLi_Pp3-Stämme.....	63
Abbildung 5: Wachstum von <i>B licheniformis</i> DSM13 und MW3 mit und ohne Mitomycin C	64
Abbildung 6: Wachstum von <i>B licheniformis</i> DSM13, Δ PBSX und Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 mit und ohne Mitomycin C	65
Abbildung 7: TEM-Bilder von Phagenpartikeln präpariert aus <i>B. licheniformis</i> DSM13 und seinen Derivaten.	66
Abbildung 8: Gelelektrophorese von Phagen-DNA isoliert aus <i>B. licheniformis</i> DSM13 und seinen Derivaten.	67
Abbildung 9: Sequenzverteilung der Phagen-DNA aus <i>B. licheniformis</i> DSM13 und MW3	68
Abbildung 10: Sequenzverteilung der Phagen-DNA aus <i>B. licheniformis</i> Δ PBSX	70
Abbildung 11: Sequenzverteilung der Phagen-DNA aus <i>B. licheniformis</i> Δ PBSX- Δ BLi_Pp3.....	72
Abbildung 12: Vektorkarte des pV2 Vektors.....	74
Abbildung 13: Restriktionskontrolle des re-isolierten pV2-Vektors	75
Abbildung 14: <i>Bacillus</i> Transkonjuganten nach Übertragung von pV2.....	75
Abbildung 15: Vektorkarte des pV3SDlacZ-Vektors	77
Abbildung 16: Transkriptionsprofil von BLi_05060 und BLi_r1585	78
Abbildung 17: β -Galaktosidase-Aktivität der Promotoren von BLi_05060 und BLi_r1585 im pV3SDlacZ Reportersystem.....	80
Abbildung 18: β -Galaktosidase-Aktivität des <i>narGHIJ</i> -Promotors im pV3lacZ Reportersystem unter anaeroben Bedingungen.....	82
Abbildung 19: Vektorkarte des pV3Xg-Vektors	84
Abbildung 20: Fluoreszenz-Mikroskopie von <i>B. licheniformis</i> MW3 pV3Xg_RS _{pbuG}	86

Abbildung 21: Vektorkarte des pV3g Vektors.....	88
Abbildung 22: Vektorkarte des pV3Xb-Vektors	89
Abbildung 23: Vektorkarte des pV3b-Vektors	91
Abbildung 24: Transkriptionsprofil des <i>apr</i> Gens	92
Abbildung 25: Promotorregion von <i>aprAs</i>	93
Abbildung 26: Gelelektrophorese der PCR-Kontrolle von <i>B. licheniformis</i> MW3 <i>AprAs</i> ⁻	94
Abbildung 27: Detektion von <i>AprAs</i> mittels <i>Northern Blot</i>	95
Abbildung 28: <i>B. licheniformis</i> MW3 und MW3 <i>AprAs</i> ⁻ auf M9 Agar mit Milchpulver.....	96
Abbildung 29: Exoproteaseaktivität von <i>B. licheniformis</i> MW3 und MW3 <i>AprAs</i> ⁻	97
Abbildung 30: Nachweis der <i>AprAs</i> -Komplementation mittels <i>Northern Blot</i> ...	98
Abbildung 31: Proteaseaktivität der <i>AprAs</i> -Komplementationsmutanten und Kontrollen	99
Abbildung 32: Transkription der <i>BLi_r2291</i> Instanzen im Genom von <i>B. licheniformis</i> DSM13	107
Abbildung 33: Sequenz- <i>Alignment</i> und Strukturvorhersage der 16 Instanzen des <i>BLi_r2291</i> RNA-Elements aus <i>B. licheniformis</i> DSM13	111
Abbildung 34: Korrelation der <i>BLi_r2291</i> Kovarianzmodell-Treffer mit der Phylogenie von 16 <i>B. licheniformis</i> Stämmen	112
Abbildung 35: Promotoraktivität von <i>yrhG</i> und <i>yrhE</i> unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat.....	114
Abbildung 36: Schleife im 5' mRNA-Bereich von <i>aprE</i> und <i>apr</i>	131
Abbildung 37: Genetische und transkriptionelle Situation am <i>ylbH</i> -Gen	133
Abbildung 38: Transkriptabdeckung des <i>glmS-Riboswitch</i> in <i>B. licheniformis</i> DSM13	135
Abbildung 39: Transkriptabdeckung des Cobalamin- <i>Riboswitch</i> in <i>B. licheniformis</i> DSM13	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Stämme	12
Tabelle 2: Verwendete Plasmide.....	13
Tabelle 3: Bezugsquellen für Chemikalien	14
Tabelle 4: Medienzusätze.....	15
Tabelle 5: Pipettierschema für Ligationsansätze.....	28
Tabelle 6: In der Untersuchung mittels Kovarianzmodellen verwendete Stämme	55
Tabelle 7: Für die phylogenetische Klassifizierung benutzt Phagen-genomen.....	59
Tabelle 8: Prophagenregionen von <i>B. licheniformis</i> DSM13	61
Tabelle 9: Fluoreszenz-Mikroskopie-Ergebnisse von <i>B. licheniformis</i> MW3 pV3Xg_RS _{pbuG}	86
Tabelle 10: Sortierung der 5'UTRs aus <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	101
Tabelle 11: Sortierung der indep RNA-Elemente aus <i>B. licheniformis</i> DSM13	102
Tabelle 12: Kandidaten für <i>cis</i> -regulatorische Elemente	103
Tabelle 13: Treffer der Kovarianzmodelle von 14 potentiellen <i>cis</i> -regulatorischen RNA-Elementen in 17 <i>B. licheniformis</i> Genomen.....	108
Tabelle 14: Treffer der Kovarianzmodelle von 14 potentiellen regulatorischen RNA-Elementen in 25 <i>Bacillus</i> Genomen.	109
Tabelle 15: Rezipientenspektrum des RP4-Konjugationssystems.....	123
Tabelle 16: Erstellte Reporterplasmide.....	124
Tabelle 17: Phylogenetische Klassifizierung von Prophagenregionen.....	161
Tabelle 18: β -Galaktosidase-Aktivität der Promotoren von BLi_05060 und BLi_r1585 im pV3SDlacZ Reportersystem.....	171
Tabelle 19: β -Galaktosidase-Aktivität des <i>narGHIJ</i> Promotor im pV3lacZ Reportersystem unter aeroben Bedingungen	171
Tabelle 20: β -Galaktosidase-Aktivität des <i>narGHIJ</i> Promotor im pV3lacZ Reportersystem unter anaeroben Bedingungen.....	171
Tabelle 21: β -Galaktosidase-Aktivität der Promotoraktivität von <i>yrhG</i> und <i>yrhE</i> unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat	172
Tabelle 22: Exoproteaseaktivität von <i>B. licheniformis</i> MW3 und MW3 AprAs	172

Tabelle 23: Proteaseaktivität der AprAs-Komplementationsmutanten und Kontrollen	172
Tabelle 24: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide	173

Abkürzungsverzeichnis

BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3'UTR	3' Untranslatierten Region (nach kodierendem Bereich)
5'UTR	5' Untranslatierten Region (vor kodierendem Bereich)
ad.	auffüllen auf
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CAA	Säure hydrolysiertes Casein
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
et al.	<i>et alia</i> = „und andere“
FMN	Flavinmononukleotid
g	Fallbeschleunigung (Zentrifugation)
g	Gramm (Gewichteinheit)
GC	Guanosin+Cytosin
H ₂ O	Wasser
kb	Kilobasen
L	Liter
M	molar
Mbp	Megabasenpaare
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minuten
mio	Million
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mM	milomolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Boten-RNA
NGS	<i>next-generation sequencing</i>

Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
pH	pH-Wert
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (quantitative- <i>Real-Time</i> PCR)
RBS	R ibosom b indestelle
Rfam	Rfam ist eine Datenbank nicht kodierender RNAs und ihrer Strukturen (http://rfam.xfam.org/)
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-seq	RNA-Sequenzierung
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunden
sRNA	<i>small</i> RNA
Gesamt RNA	gesamte RNA einer Zelle
tRNA	Transfer RNA
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
~	etwa

1 Einleitung

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) versucht mit der Förderinitiative "Industrielle Genomforschung an Mikroorganismen" – "GenoMik Industrie" eine Brücke zu schlagen zwischen der akademischen Forschung und der Industrie. Im Rahmen dieser Förderinitiative ist das Projekt, "Der Energie- und Biosynthesestoffwechsel von *Bacillus licheniformis*: eine Komparative Analyse der Regulatorischen Netzwerke von Produktions- und Wildtypstämmen", angesiedelt. In diesem Projekt soll mit Mitteln der Genomanalyse *Bacillus licheniformis* im Rahmen einer industriellen Subtilisin-Produktion untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden während der genannten Subtilisin Produktion zu fünf verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und die Transkriptome der gezogenen Zellen sequenziert. Die Auswertung dieser Transkriptome diene als Grundlage, um im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation, RNA-basierte Regulatoren zu identifizieren und zu untersuchen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen im Idealfall die Steigerung der Leistungsfähigkeit von *Bacillus licheniformis* als Produktionsorganismus ermöglichen. Parallel sollten molekularbiologische Methoden etabliert werden, um das oben genannten Ziels zu erreichen.

1.1 *Bacillus*

Bei der Gattung *Bacillus* handelt es sich um aerobe, stäbchenförmige Endosporenbildende gram positive Bakterien [1]. Die resistenten Endosporen dieser Gattung können nachweislich bis zu 250 Millionen Jahre lebensfähig überdauern [2]. Sie können Aerosole bilden und mittels dieser in der Umwelt verbreitet werden [3, 4], was *Bacillus* ubiquitär auftreten lässt. Vertreter der Gattung *Bacillus* können aus ökologisch sehr diversen Habitaten isoliert werden. Die Gattung beinhaltet beispielsweise pathogene, aquatische, Tiefsee-assoziierte, halophile und im Boden auftretende *Bacillus*-Arten [5].

Die beiden am besten untersuchten phylogenetischen Gruppen sind die Cereus-Gruppe, welche bekannte Pathogene wie *B. cereus*, *B. anthracis*, und *B. thuringiensis* beherbergt [6], und die Subtilis-Gruppe mit Vertretern wie *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* und *B. pumilus* [5, 7]. Manche Stämme der genannten Gruppen sind wirtschaftlich interessant. Stämme der

Spezies *B. thuringiensis* sind als Invertebratenpathogene bekannt und werden als wichtiges biologisches Insektizid eingesetzt [8]. Toxingene von *B. thuringiensis* wurden für die Erstellung transgener Pflanzen verwendet. Damit wird der Konsum des Pflanzenmaterials für Insekten tödlich [9], so dass keine Behandlung mit Insektiziden nötig ist. *B. subtilis* findet beispielsweise Anwendung bei der Aroma-Veredelung des Tabaks [10] und der Vanilleschoten [11]. Im Lebensmittelbereich werden Stämme dieser Art zur Herstellung alkalisch fermentierter Produkte, wie des Japanischen Natto [12] benutzt. In der Tierzucht finden Stämme von *B. subtilis* und *B. licheniformis* [13] Anwendung als probiotischer Tierfutterzusatz zur Stärkung der Tiergesundheit (V. (EG) Nr. 2148/2004). Sowohl *B. subtilis* als auch *B. licheniformis* sind durch die zentrale Kommission für biologische Sicherheit (ZKBS) in die Risikogruppe 1 eingestuft (Stand 2014) und gelten damit sowohl im Produktionsbereich als auch im Laborbereich als sicher.

Im Bereich der industriellen Enzymproduktion zeichnen sich *Bacillus* Stämme durch ihre Fähigkeit aus, sehr hohe Enzymmengen sekretieren zu können, dabei werden Konzentrationen von 20-25 g pro Liter erreicht. Hier tritt besonders *Bacillus licheniformis* hervor, da sich dieser sowohl als Quelle für industriell relevante Enzyme als auch als Produktionsstamm bewährt hat [14].

1.2 *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis ist in der Gattung *Bacillus* in die Subtilis-Gruppe einzuordnen [7]. Der Organismus wächst im Temperaturbereich zwischen 15 °C und 55 °C. Ausnahmen mit Temperaturmaxima von 68 °C sind beschrieben [15]. *B. licheniformis* wächst in Gegenwart von 7% NaCl und bei pH Werten von 5,8 bis 6,8, wobei die Werte nicht begrenzend sind. Casein, Aesculin, Gelatine und Stärke werden von diesem Organismus hydrolysiert. Er ist Katalase positiv und Oxidase variabel. Einige Stämme besitzen die Fähigkeit Harnstoff zu hydrolysieren. Pektin und weitere pflanzliche Polymere werden von *B. licheniformis* Stämmen degradiert. Die meisten Stämme können Zitronensäure und Propionsäure verwerten und Nitrat zu Nitrit reduzieren. Üblicherweise wird *B. licheniformis* aus Erde oder Kompost vereinzelt, wobei er auch aus Raupen, Federn, von Pflanzenwurzeln, inneren Pflanzenteilen, Leder, Milch, Pappe und Oberflächen von Steindenkmälern isoliert wurde [1]. Diese Vielfalt an Standorten

lässt bereits vermuten, dass *B. licheniformis* auf Stoffwechselebene ein anpassungsfähiger Organismus ist. Die gewonnenen Enzyme aus *B. licheniformis* sind hauptsächlich Hydrolasen natürlicher Polymere, wie Lichenasen [16], Lipasen [17], Phytasen [18, 19], Pektinasen [20], Laccasen [21], Levansucrasen [22], Keratinasen [23], alkalische Proteasen [21, 23–29], thermostabile alpha-Amylasen [30], Dextranasen [31] und Chitenasen [32]. Diese Enzyme spiegeln die saprophytische Lebensweise von *B. licheniformis* wieder und sind im Einklang mit seinem hauptsächlichlichen Habitat dem Boden und Kompost.

Der vielfältige Stoffwechsel ist auch beim Einsatz von *B. licheniformis* als Produktionsorganismus interessant, da dieser auf einfachen organischen Substraten angezogen werden kann [24]. Das ist wichtig, da 30 % bis 40 % der Produktionskosten bei der Enzymherstellung alleine für das Medium veranschlagt werden [33]. Vergleichend mit *B. subtilis* und *E. coli* erreicht *B. licheniformis* oft höhere Zelldichten [34] und höhere Produktkonzentrationen [14].

Das Genom des Typstammes *B. licheniformis* DSM13 / ATCC14580 wurde in zwei unabhängigen Projekten von Rey *et al.* 2004 (Davis, USA) [35] und Veith *et al.*, 2004 (Göttingen, Deutschland) [36] sequenziert und untersucht. Es ist 4,2 Mbp groß, beherbergt keine Plasmide, und beinhaltet 4208 [35] bzw. 4286 [36] Protein kodierende Regionen, 72 tRNA-Gene und 7 rRNA-Operons. Der G+C Gehalt ist 46,2%. Die offenen Leserahmen der proteinkodierenden Gene sind überwiegend in Replikationsrichtung orientiert. Der Organismus besitzt alle Gene für die Synthese von proteinogenen Aminosäuren und Vitaminen und kann somit für sein Wachstum alle notwendigen Bestandteile selbständig synthetisieren. Darüber hinaus wurden viele Gene für sekretorische Proteine zur Hydrolyse von Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und weiteren nährstoffhaltigen Polymeren identifiziert.

Im Unterschied zu *B. subtilis* weist *B. licheniformis* DSM13 Gene für den Glyoxylatzyklus auf, welche ihm das Wachstum auf C2-Substraten, wie Acetat, ermöglichen [37]. Hinzu kommt eine genetische Ausstattung, welche die Verwertung von Zellulose gestattet, deren Funktionalität auch experimentell bestätigt wurde [35].

In Bezug auf die kaum vorhandene genetische Kompetenz von *B. licheniformis* DSM13, wurden durch Rey *et al.*, 2004 [35] im Genom potentielle Gründe hierfür aufgezeigt. Zum einen wurden zwei Typ I Restriktionssysteme identifiziert,

welche als Schutz vor exogener DNA mit nicht kompatibelem Methylassmuster dienen, zum anderen wurde eine Insertion in *comP* gefunden, einem für die frühe Phase der genetischen Kompetenz wichtigen Gen in *B. subtilis* [38]. Dass die Restriktionssysteme tatsächlich entscheidend für die genetische Zugänglichkeit sind, wurde durch Waschkau *et al.*, 2008 [39] belegt. Die Unterbrechung von *comP* konnte wiederum nicht als Grund für die geringe genetische Kompetenz identifiziert werden, da seine Wiederherstellung sogar eine weitere Reduzierung der Transformationsraten zur Folge hatte [40].

1.3 Phagen

Bakteriophagen, oder auch Phagen, sind auf Prokaryoten spezialisiert Viren. Diese benötigen den Stoffwechsel ihres Wirts, um sich selbst zu reproduzieren. Sie sind sehr heterogen, sowohl in der Form als auch in der Art ihres Genoms und sind die abundanteste biologische Entität in der Umwelt [41]. Der Lebenszyklus von Phagen kann hauptsächlich in lytisch und lysogen aufgeteilt werden. Vertreter des lytischen Lebenszykluses werden lytische Phagen genannt. Diese beginnen sofort nach der Infektion des Wirts mit der eigenen Partikelreproduktion, töten somit umgehend den Wirt und lysieren diesen zur Freisetzung neuer Phagenpartikel. Vertreter des lysogenen Lebenszykluses werden als temperente Phagen bezeichnet. Diese können, wie die lytischen Phagen auch, sofort nach der Infektion reproduzieren, doch zeichnen sich diese vor allem durch die Fähigkeit aus, dies nicht sofort zu tun. Temperente Phagen können sich nach der Infektion stabil in das Genom des Wirtes integrieren, sei es mittels Integration ins Chromosom oder die stabile Replikation als Plasmid. Solche ins bakterielle Genom integrierten Phagen werden als Prophagen bezeichnet. Der Wirt wird nicht sofort getötet und verbreitet durch die eigene Vermehrung auch den Prophagen mit [42]. Im Gegensatz zum lytischen Phagen ist die Beziehung zwischen Wirt und temperenten Phagen nicht rein parasitärer Natur. Ein Prophage kann seinem Wirt neue Eigenschaften vermitteln, die ihm im allgemeinen Konkurrenzkampf entscheidende Vorteile verschaffen. So schützen Prophagen ihren Wirt oft gegen Infektionen nah verwandter Phagen, können den Wirt mit Restriktions / Modifikations (RM)-Systemen ausstatten, Antibiotikaresistenzen vermitteln oder die Pathogenität des Wirts steigern [43]. Allerdings besitzen Prophagen weiterhin die Fähigkeit in den lytischen Lebenszyklus zu wechseln.

Der Prophage kann den physiologischen Zustand seines Wirtes ermitteln und wenn es diesem „schlecht geht“ in den lytischen Zyklus umschalten. Dabei wird der Phage repliziert und sein Wirt zerstört [42]. Verbleibt der Prophage sehr lange im Wirt, so kann auch der Wirt die Funktionalität des Prophagen beeinflussen. Hierbei werden die für den Wirt nicht relevanten Bereiche mittels Mutation und Deletion degradiert. Dabei entstehen defektive Prophagen, die keine funktionalen Phagenpartikel mehr bilden können, oder nur noch als Prophagenrudiment im Wirtsgenom verbleiben [42, 44].

Der Übergang von Prophagen in den lytischen Zyklus kann bei industriellen Fermentationen beobachtet werden [45, 46]. Die Enzymproduktionen, wie beispielsweise von Serinproteasen, beginnt nach der exponentiellen Wachstumsphase [47]. In dieser Phase ist der Organismus aufgrund begrenzender Faktoren an den Grenzen seines Wachstums. Diese wachstumsbegrenzenden Bedingungen können die im Organismus reprimierten Prophagen induzieren und somit den lytischen Zyklus aktivieren. Die lysierenden Zellen können nicht mehr zur Produktion beitragen, was große ökonomische Auswirkungen hat und bis zum Abbruch des Produktionsprozesses führen kann [45, 46, 48].

Eine frühe Form der Prophagenuntersuchung beruhte darauf, den bakteriellen Stamm von Interesse mittels eines induzierenden Agens, wie Mitomycin C, zu behandeln und damit die Prophagen zu aktivieren. Die Phagenpartikel wurden anschließend gereinigt und mit Methoden wie Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie untersucht [49]. Im Fall von *B. licheniformis* DSM13 wurde seine Lysogeny an den äquivalenten Stämmen LMD 50.16 und LMD 75.15 [50] untersucht. Hierbei wurde für den Stamm LMD 50.16 ein Phagenpartikel und für den Stamm LMD 75.15 zwei unterschiedliche Phagenpartikel identifiziert [51, 52].

Der Beginn der Sequenzierung und Analyse von bakteriellen Genomen hat die Untersuchung von Prophagen entscheidend vorangebracht. Danach konnte direkt überprüft werden, ob, wo und wie viele potentielle Prophagen sich im Genom eines Organismus befinden [53]. Oft beherbergt ein Organismus mehrere Prophagen und ihre Gesamtheit kann bis zu 20% des Gesamtgenoms ausmachen [42, 54]. Es wird vermutet, dass der genetische Prophagenpool bis zu 23% des gesamten genetischen Phagenpools ausmacht [55]. Im Falle der beiden unabhängigen *B. licheniformis* DSM13 Genomsequenzierprojekte von 2004

wurden drei Prophagen [35] bzw. vier Prophagen [36] manuell annotiert. Mittlerweile stehen bioinformatischer Werkzeuge zur Verfügung, die es ermöglichen, ganze Genome systematisch, schnell und unkompliziert auf ihren potentiellen Prophagengehalt zu untersuchen. Diese nutzen hauptsächlich die Sequenzbesonderheiten der Prophagen und einen Abgleich gegen vorhandene Phagen-Datenbanken um Prophagen zu identifizieren [56–59]. *Prophage Finder* ist eines dieser Werkzeuge [56]. Dieses Programm ist über eine *Web*-Oberfläche zugänglich und hat den Vorteil, dass es mit einer FASTA-Datei umgehen kann und somit von der Annotation unabhängige Vorhersagen macht. PHAST ist ein weiteres Programm zur Prophagenvorhersage [58]. Es ist auch über eine *Web*-Oberfläche zugänglich. Im Vergleich zum *Prophage Finder* liefert es zusätzlich Analysen und grafische Ausgaben. PHAST kann Eingabedateien mit und ohne Annotation verwenden und variiert, abhängig von der Eingabe, im Ergebnis. Unabhängig vom verwendeten Programm haben alle bioinformatischen Herangehensweisen die Einschränkung, dass die Ergebnisse reine Vorhersagen sind und eine experimentelle Verifikation notwendig ist.

1.4 Genetische Zugänglichkeit von *Bacillus* Stämmen

B. subtilis 168 ist der am besten untersuchte Modellorganismus für genetische Kompetenz in Gram-positiven Bakterien [38, 60]. Seine genetische Kompetenz ist aber keine natürliche Erscheinung. Dieser Stamm ist durch Mutagenese entstanden und wurde gezielt aufgrund seiner überdurchschnittlichen genetischen Kompetenz ausgewählt [61]. Nah verwandte Wildtyp-Stämme [62] und vor allem industriell relevante Stämme [63] lassen sich oft kaum genetisch manipulieren und sind nur mit Methoden wie Elektroporation, Protoplastentransformation oder Konjugation anzugehen [14].

In *B. licheniformis* DSM13 ist die Situation, in Bezug auf die genetische Kompetenz, besonders erschwert, da zwei Type I Restriktionssysteme die Zelle vor fremder DNA schützen [35]. Erste Erfolge in Bezug auf genetische Zugänglichkeit wurden mit der Erstellung des Arbeitsstammes *B. licheniformis* MW3, einem Derivat des Typstammes *B. licheniformis* DSM13, erzielt. Die Entfernung beider Restriktionssysteme führte zu einer besseren genetischen Zugänglichkeit der entsprechenden Mutante MW3 [39]. Erst nach diesem Schritt war es möglich eine genetische Kompetenz im *B. licheniformis* MW3 mittels

Manipulation des Kompetenzapparates zu erzielen [40, 64]. Hierbei wurde der Haupttranskriptionsfaktor ComK der späten Kompetenzgene mittels eines durch Xylose induzierbaren Promotors überexprimiert [40]. Die erhöhte Menge an ComK-Protein induziert die verstärkte Bildung des Kompetenzapparates. Das Kompetenzsystem wurde somit von den regulatorischen Kontrollgenen abgekoppelt und somit gezeigt, dass der DNA-Aufnahmeapparat von *B. licheniformis* voll funktional ist. Dadurch können hohe Transformationsraten erzielt werden, was eine direkte Anwendung von genetischen Werkzeugen, wie des pMutin Systems [65], ermöglicht [40].

Ein weiterer Schritt hin zum besseren genetischen Arbeiten mit *B. licheniformis* war die Entwicklung des konjugativen pKVM Deletionssystems [66]. Es ermöglicht die einfache und zuverlässige Erstellung von markerlosen Deletionen in *B. licheniformis* und nahverwandten Arten. Das Besondere an diesem System ist, dass mittels des Konjugationsapparats des RP4-Plasmids [67] ein Wildtypstamm direkt und ohne vorbereitende Manipulation DNA aufnehmen kann. Somit kann das RP4-Konjugationssystem dafür genutzt werden, plasmidbasierte genetische Werkzeuge auf *B. licheniformis* zu übertragen.

1.5 RNA-Regulatoren

Neben der lange bekannten Funktion von RNA als Informationsträger in Form von mRNA und in der Proteinbiosynthese in Form von tRNA und rRNA, kann RNA auch regulatorische Aufgaben wie z. B. bei der Expressionskontrolle von metabolischen Stoffwechselwegen [68], bei Stressantworten [69] oder Entwicklungsprozessen [70] übernehmen.

Regulatorische RNAs können in Bezug auf ihren Wirkungsort in zwei Kategorien aufgeteilt werden. Bei der einen Gruppe handelt es sich um co-transkribierte RNA (in *cis*) in Bezug auf ihren regulatorischen Wirkungsort (mRNA). Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um unabhängig zu ihrem Wirkungsort transkribierte RNA (in *trans*) [71].

In *cis* transkribierte regulatorisch wirkende RNA-Elemente (*cis*-regulatorische RNA-Elemente) sind Bestandteil desselben RNA-Moleküls auf das sie regulatorisch einwirken. Dabei sind diese in der 5'-untranslatierten Region (5'UTR) eines mRNA-Transkripts lokalisiert [68]. Diese regulatorischen Einheiten können Strukturen annehmen, die auf Faktoren wie Temperatur,

unbeladene tRNAs, Proteine oder Assoziation mit einem Ribosom mit Änderung der Struktur reagieren und die Expression dahinter liegender Gene regulieren [72]. Eine prominente Gruppe der *cis*-regulatorischen Elemente sind *Riboswitches* [72]. Diese bestehen aus Aptameren und Expressionsplattform [73]. Aptamere der *Riboswitches* sind Strukturen zur Erkennung des Interaktionspartners und haben in etwa eine Größe von 70 bis 170 Nukleotiden (nt) [74]. Die Expressionsplattform reguliert die Genexpression und beherbergt oft einen intrinsischen Terminator, der bei entsprechender Konformation die Transkription der mRNA unterbindet [75]. Dabei ist der *Riboswitch* auf die Interaktion mit einfachen Molekülen ausgerichtet und benötigt kein Protein als Interaktionspartner [68].

In *trans* transkribierte regulatorisch wirkende RNA-Elemente (*trans*-regulatorische RNA-Elemente) können in Bezug auf ihren regulatorischen Wirkungsort sowohl in *cis* als auch in *trans* lokalisiert sein. Jedoch handelt es sich immer um eine separat transkribierte RNA, die mit keiner mRNA verbunden ist [71]. *Trans*-regulatorische RNA-Elemente haben in etwa eine Größe von 35 bis 200 nt und sind damit verhältnismäßig klein (*small* RNA = sRNA) [71, 76]. In Bezug auf ihre Interaktionspartner können sie aufgeteilt werden in Protein-interagierende und mRNA-interagierende sRNAs [73]. Durch die Interaktion von sRNAs mit Proteinen entziehen sie diese ihrer eigentlichen Aufgabe und entfalten dadurch ihre regulatorische Funktion [77–79]. Die Gruppe der sRNAs die mit mRNA interagiert kann weiter aufgeteilt werden in *cis* und *trans* lokalisierte sRNAs [73]. *Cis* lokalisierte sRNAs kodieren auf dem Gegenstrang ihrer Ziel-mRNA und haben dadurch einen hohen Anteil an komplementärer Fläche zu ihrem Interaktionspartner [73]. Am Beispiel von *txpA* und *yonT*, einem Toxin/Antitoxin System Typ I aus *B. subtilis* 168, konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von *cis* lokalisierten sRNAs zum Abbau der sRNA-mRNA-Komplexe führt und damit die Expression von *txpA* und *yonT* reduziert wird [80]. *Trans* lokalisierte sRNAs sind weder mit ihrer Ziel-mRNA direkt verbunden noch sind diese auf dem Gegenstrang von dieser kodiert. Sie interagieren mit ihrer Ziel-mRNA mittels Basenpaarung [73]. In der Literatur erwähnte Beispiele von *trans* lokalisierten sRNAs haben oft eine kürzere Interaktionssequenz mit eingeschränkter Homologie zu ihrer Ziel-mRNA. In *E. coli* ist gezeigt worden, dass das Hfq Protein, ein RNA-Chaperon, eine entscheidende Rolle in der

Regulation durch diese RNA-Klasse spielt [73, 81]. Das Beispiel der Qrr1-5 sRNAs aus *Vibrio harveyi* zeigt, dass *trans* lokalisierte sRNAs mehrere Interaktionspartner haben können und dadurch fähig sind global zu regulieren [82].

Viele regulatorische RNAs blieben lange unentdeckt, da bei ihnen keine allgemeingültigen Kriterien, vergleichbar mit Start- und Stopcodon bei Proteinkodierenden Genen, vorliegen [83]. Nach der primären Beobachtung der intergenen Lokalisation von sRNAs in *E. coli*, wurde in diesen Bereichen systematisch mittels Bioinformatik nach Promotoren, Terminatoren und konservierten Strukturen gesucht, um Kandidaten für potentiell neue sRNA zu identifizieren [84]. Die gekoppelte Aufreinigung von sRNAs mit dem Hfq-Protein ermöglichte die experimentelle Erfassung von sRNAs [85, 86]. Jedoch blieb die letztgenannte Herangehensweise auf Organismen beschränkt, die ein Hfq Protein besitzen [81].

Bei den *cis*-regulatorischen Elementen wurden RNA-*Switches* früh beschrieben. Diese erfüllten die frühen Konzepte eines proteinogenen Effektors, der eine bestimmte Schaltstruktur der RNA in der 5'UTR stabilisiert und damit reguliert. Der PyrR-RNA- *Switch* ist ein Beispiel für diese Art von Regulator [87].

Die ersten *Riboswitches* sind im Rahmen von Genuntersuchungen als verlängerte 5'UTRs aufgefallen, die potentiell die Fähigkeit besitzen eine Sekundärstruktur auszubilden. Diese Sekundärstrukturen waren früh im Verdacht regulatorisch zu wirken, jedoch konnten keine Proteinregulatoren identifizieren werden [88]. Später stellte sich heraus, dass diese RNA-Sekundärstrukturen durch Interaktion oder nicht-Interaktion mit einem einfachen Metaboliten zwischen Transkription und Transkriptionstermination schalten können und damit ohne Beitrag eines Proteins regulatorisch wirken. Exemplarisch sei hier der Thiamin-*Riboswitch* und der Flavinmononukleotid (FMN) *Riboswitch* genannt [89, 90].

Mit den Mitteln der Bioinformatik wurden weiter *cis*-regulatorische RNAs erschlossen [91]. Hierbei wurden Sequenzabschnitte vor Protein-kodierenden Bereichen automatisiert auf potentielle Strukturen überprüft. Ist eine potentielle Struktur beobachtet worden, so wurde unter Zuhilfenahme orthologer Instanzen ein *Alignment* erstellt, das als Grundlage für die Erstellung eines Kovarianzmodells diene, mit dem wiederum effektiver nach weiteren Instanzen

eines *cis*-regulatorischen Elements im gleichen Genom, oder in anderer Arten, gesucht werden konnte [91–93].

Die Erstellung eines Transkriptomts mittels Sequenzierung und seine Auswertung eröffnen neue Möglichkeiten bei der Identifizierung regulatorischer RNAs. Der Vorteil gegenüber den vorangehenden bioinformatischen Ansätzen ist die Tatsache, dass es sich um real in den Zellen vorliegende RNA handelt und nicht um deren Vorhersage. Durch das basengenaue Zuordnen der RNA-Sequenzen zu ihrem Ursprung im Genom kann die Lokalisation, Größe und der genomische Kontext ermittelt werden. Mit diesem Ansatz konnten viele nicht-kodierende RNAs erfolgreich in *B. subtilis* 168 identifiziert werden [71]. Im Rahmen des Projekts, in das auch diese Promotionsarbeit eingebettet ist, wurden Transkriptomsequenzdaten von *B. licheniformis* DSM13 erstellt und dadurch eine große Anzahl nicht-kodierender RNA-Elemente offen gelegt [94]. Die tiefere Auswertung dieser Daten und die experimentelle Analyse ausgewählter Kandidaten ist ein Bestandteil dieser Arbeit.

1.6 Ziele der Arbeit

Die Ziele der hier vorgelegten Arbeit sind: (i) die Analyse von Prophagen, (ii) die Erstellung von genetischen Werkzeugen in Form von *Shuttle*-Vektoren und Reporterplasmiden, die für die experimentelle Analyse regulatorischer Elemente genutzt werden können, und (iii) die Identifikation und Untersuchung von regulatorischen RNAs mit Einfluss auf eine produktive Fermentation.

- (i) In unserer Arbeitsgruppe wurden RNA-seq Datensätze von ausgewählten Wachstumsphasen einer industrienahen Fermentation erstellt. Diese Datensätze, sowie aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse sollen als Grundlage für eine Reannotation des *B. licheniformis* DSM13 Originalgenoms von 2004 (AE017333) dienen. Im Rahmen dieser Reannotation soll ein Schwerpunkt auf die Identifikation von Prophagen gelegt werden und zusätzlich Methoden entwickelt werden, um die Aktivität der Prophagen experimentell zu erschließen.
- (ii) Aufgrund der schwierigen genetischen Zugänglichkeit von *B. licheniformis* DSM13 ist der Großteil der für *Bacillus* entwickelten gentechnischen

Methoden nur unter großem Aufwand verwendbar. Aus diesem Grund sollen im Rahmen dieser Arbeit konjugative *Shuttle*-Vektoren und Reporterplasmide entwickelt werden, die sich einfach und unkompliziert für die Untersuchungen von regulatorischen Elementen in *B. licheniformis* einsetzen lassen. Dabei soll auch die Verwendung in weiteren nahverwandten, nicht domestizierten Stämmen, möglich sein. Die im Punkt (iii) ermittelten regulatorischen Elemente sollten mit diesen Vektoren experimentell untersucht werden.

- (iii) Der Fokus bei der initialen Analyse der RNA-seq basierten Transkriptomdaten lag auf der Identifikation von regulatorischen RNAs mit einem möglichen Einfluss auf die Produktivität der Fermentation. Dabei ist unter anderem ein RNA-Element beobachtet worden, das mit der Subtilisin Protease, kodiert durch das *apr* Gen, assoziiert ist. Dieses RNA-Element soll auf sein regulatorisches Potential überprüft werden. Außerdem soll die Auswertung der erstellten RNA-seq Daten vertieft werden, mit dem Ziel potentiell neue *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren. Einzelne Kandidaten sollen nach Möglichkeit experimentell untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

In der Arbeit verwendete Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt und die in der Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Stämme

Stamm	Beschreibung	Quelle / Ref.
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	Laborstamm- sammlung / [95]
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , λ ⁻	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17-1	Sm ^R , Tp ^R , <i>mod</i> ⁺ , <i>res</i> ⁻ , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> ⁻ , RP4- Tc::Mu-Km::Tn7	Laborstamm- sammlung / [96]
<i>B. licheniformis</i> DSM13	Type-Stamm	DSMZ Braunschweig / [35, 36]
<i>B. licheniformis</i> MW3	<i>B. licheniformis</i> DSM13 (Δ <i>hsdR1</i> , Δ <i>mcrA</i> , Δ <i>hsdR2</i>)	Prof. Dr. Friedhelm Meinhardt, University Münster / [39]
<i>B. licheniformis</i> 9945A	Wildtype	Bacillus Genetic Stock Center / [97]
<i>B. licheniformis</i> BAE*	Wildtype	Laborstamm- sammlung [98–100]
<i>B. subtilis</i> 168 (DSM402)	Δ <i>trpC2</i>	DSMZ Braunschweig / [101, 102]
<i>B. subtilis</i> NCIB3610	Wildtype	Bacillus Genetic Stock Center / [61]
<i>B. megaterium</i> PV311	pUB110	Bacillus Genetic Stock Center
<i>B. licheniformis</i> DSM13 pV3SDlacZ	<i>B. licheniformis</i> DSM13 mit pV3SDlacZ	Diese Arbeit

Stamm	Beschreibung	Quelle / Ref.
<i>B. licheniformis</i> DSM13 pV3SDlacZ_P _{BLi_05060}	<i>B. licheniformis</i> DSM13 mit pV3SDlacZ_P _{BLi_05060}	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> DSM13 pV3SDlacZ_P _{BLi_r1585}	<i>B. licheniformis</i> DSM13 mit pV3SDlacZ_P _{BLi_r1585}	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 pV3lacZ_P _{narG}	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit pV3lacZ_P _{narG}	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 pV3lacZ_P _{narG}	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit pV3lacZ_P _{narG}	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 pV3lacZ_P _{yrhE}	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit pV3lacZ_P _{yrhE}	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 pV3lacZ_P _{yrhG}	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit pV3lacZ_P _{yrhG}	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 pV3Xg	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit pV3Xg	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 pV3Xg_RS _{pbuG}	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit pV3Xg_RS _{pbuG}	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 AprAs ⁻	<i>B. licheniformis</i> DSM13 (Δ hsdR1, Δ mcrA, Δ hsdR2, AprAs ⁻)	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 pV2aprAs	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit pV2aprAs	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 AprA ⁻ pV2aprAs	<i>B. licheniformis</i> MW3 AprA ⁻ mit pV2aprAs	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 pV2	<i>B. licheniformis</i> MW3 mit pV2	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> MW3 AprA ⁻ pV2	<i>B. licheniformis</i> MW3 AprA ⁻ mit pV2	Diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i> Δ PBSX	<i>B. licheniformis</i> MW3 (Δ hsdR1, Δ mcrA, Δ hsdR2, Δ BLi_Pp2)	Laborstamm- sammlung [66]
<i>B. licheniformis</i> Δ PBSX- Δ BLi_Pp3	<i>B. licheniformis</i> Δ PBSX (Δ hsdR1, Δ mcrA, Δ hsdR2, Δ BLi_Pp2, Δ BLi_Pp3)	Diese Arbeit

*Bei Stamm *B. licheniformis* BAE handelt es sich um *Bacillus aeolius* DSM 15084 [98, 99]. Da neuere Erkenntnisse darauf hinweisen, dass es sich um einen *B. licheniformis* [100] handelt, wurde dieser in dieser Arbeit als solcher geführt.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotype	Wirt	Referenz
pSG1151	<i>bla cat gfpmut1</i>	<i>E. coli</i>	[103]
pUB110	<i>kan</i>	<i>Bacillus</i>	[104]
pKVM1	<i>bla ermC (PclpB-bgaB) oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	[66]
pAC6	<i>bla (amyE) SD_{sacB}-lacZ cat 'amyE)</i>	<i>E. coli</i>	[105]

Plasmid	Genotype	Wirt	Referenz
pAC7	<i>bla (amyE) lacZ kan (amyE)</i>	<i>E. coli</i>	[106]
pV1	<i>bla kan</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV2	<i>bla kan oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3SDlacZ	<i>bla kan SD_{sacB}-lacZ oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3lacZ	<i>bla kan lacZ oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3SDlacZ_ P _{BLi_05060}	<i>bla kan P_{BLi_05060}-SD_{sacB}-lacZ oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3SDlacZ_ P _{BLi_r1585}	<i>bla kan P_{BLi_r1585}-SD_{sacB}-lacZ oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3lacZ_ P _{narG}	<i>bla kan P_{narG}-lacZ oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3lacZ_ P _{yrhE}	<i>bla kan P_{yrhE}-lacZ oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3lacZ_ P _{yrhG}	<i>bla kan P_{yrhG}-lacZ oriT</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3Xg	<i>bla kan xylR PxylAB-gfp</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3g	<i>bla kan gfp</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3Xg_RS P _{pbuG}	<i>bla kan xylR PxylAB-RS_{pbuG}-gfp</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3Xb	<i>bla kan xylR PxylAB-bgaB</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV3b	<i>bla kan bgaB</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pKVM2 AprAs ⁻	Deletionsvektor für <i>B. licheniformis</i> DSM13 und seinen Derivate	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pKVM2 ΔBLi_ Pp3	Deletionsvektor für <i>B. licheniformis</i> DSM13 und seinen Derivate	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit
pV2aprAs	Vektor zur Komplementation der <i>B. licheniformis</i> <i>MW3 AprAs⁻</i>	<i>E. coli, Bacillus</i>	Diese Arbeit

2.2 Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

In dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Bestandteile von Nährmedien wurden von den in Tabelle 3 aufgeführten Anbietern bezogen.

Tabelle 3: Bezugsquellen für Chemikalien

Anbieter	Anschrift	Webpräsenz
Carl Roth GmbH + Co. KG	Schoemperlenstraße 3-5 76185 Karlsruhe	www.carlroth.de
AppliChem GmbH	Ottoweg 4 64291 Darmstadt	http://www.applichem.com
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2 89555 Steinheim	http://www.sigmaaldrich.com

2.3 Mikrobiologische Methoden

In dieser Arbeit sind folgende mikrobiologische Methoden eingesetzt worden.

2.3.1 Sicherstellung der Keimfreiheit im Arbeitsmaterial

Um Gerätschaften keimfrei zu bekommen, wurden diese bei 121 °C für 21 Minuten und 2,2 bar autoklaviert. Gleichsam wurde mit thermostabilen Medien und Lösungen verfahren. Handelte es sich um thermolabile Chemikalien, so wurden diese sterilfiltriert unter Verwendung eines Sterilfilters mit der Porengröße 0,2 µm. Ausnahmen stellten Lösungen dar, die bereits in sterilisierenden Lösungsmitteln gelöst wurden, wie Ethanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Diese wurden keiner weiteren Behandlung unterzogen.

2.3.2 Verwendetes Wasser

Für das Ansetzen von Medien, Lösungen und Puffern wurde immer hochreines Wasser verwendet (H₂O). Dafür wurde das voll entsalzte Wasser aus der Hausleitung mittels einer Reinigungsanlage, der Arium Pro von Sartorius, Göttingen, aufbereitet.

2.3.3 Medienzusätze

Die verwendeten Antibiotika und Supplemente sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Medienzusätze

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration	Lagerung
Ampicillin	H ₂ O	100 mg/ml	100µg/ml	-20 °C
Kanamycin	H ₂ O	25 mg/ml	25 µg/ml	-20 °C
Erythromycin	Ethanol	5 mg/ml	5 µg/ml	-20 °C
Tetracyclin	70% Ethanol	20 mg/ml	20 µg/ml	-20 °C
Polymyxin B	H ₂ O	20 mg/ml	20 µg/ml	-20 °C
Mitomycin C	H ₂ O	1 g/ml	variabel	-20 °C
X-Gal	DMSO	8% (w/v)	0,008%	-20 °C
Guanosin	-	-	1 mM	-

2.3.4 Medien und Nährböden

Zur Herstellung von festen Nährböden wurde dem zugrundeliegenden Nährmedium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugesetzt.

2.3.4.1 NB-Medium

NB-Medium ist ein reiches Proteinmedium und wurde zur Kultivierung von *Bacillus* Stämmen verwendet. Für seine Herstellung wurde 8 g Nährbouillon (5 g Rindfleischextrakt und 3 g Pepton aus Gelatine) in einem Liter Wasser gelöst und autoklaviert.

2.3.4.2 LB-Medium

LB-Medium [107] ist ein Komplexmedium und wurde zur Anzucht von *E. coli* und *Bacillus* verwendet.

10 g	Trypton/Pepton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl
ad. 1 L	H ₂ O

2.3.4.3 SP-Medium

Das SP-Medium eignet sich zur Herstellung von Sporensuspensionen oder Sporenplatten von *Bacillus*.

8 g	Nutrient Broth
0,25 g	MgSO ₄ · H ₂ O (entspricht 1ml 1 M-Lösung)
1 g	KCl (entspricht 13,4 ml 1 M-Lösung)
ad. 1 L	H ₂ O

Nach dem Autoklavieren wurden die folgenden sterilen Lösungen zugesetzt.

1 ml	CaCl ₂ (0,5 M)
1 ml	MnCl ₂ (10 mM)
2 ml	Ammoniumeisencitrat braun (2,2 mg/ml)

2.3.4.4 Mineralmedium für *Bacillus*

Zur Herstellung des Mineralmediums [36] wurden Phosphatpuffer und Spurenelementlösung getrennt angesetzt und nach dem Autoklavieren zugefügt. Dem Medium wurde nach Bedarf Xylose oder Glucose also Kohlenstoffquelle zugesetzt.

10 ml	NH ₄ Cl (1 M)
1 ml	CaCl ₂ (100 mM)
1 ml	MgSO ₄ (500 mM)
ad. 849 ml	H ₂ O
nach dem Autoklavieren sterile Zugabe von:	
100 ml	Phosphatpuffer
1 ml	SL9
50 ml	Glukose oder Xylose (1 M)

Phosphatpuffer pH 7,5 (0,4 M)

143.26 g	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O
ad. 1 L	H ₂ O
5.44 g	KH ₂ PO ₄
ad. 100 ml	H ₂ O

Der pH-Wert wurde durch Zugabe der KH₂PO₄-Lösung in die Na₂HPO₄-Lösung auf 7,5 eingestellt.

Spurenelementlösung SL9

12,8 g	Nitrilotriessigsäure
2 g	FeCl ₂ · 4 H ₂ O
70 mg	ZnCl ₂
100 mg	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
6 mg	H ₃ BO ₃
190 mg	CoCl ₂ · 6 H ₂ O
2 mg	CuCl ₂ · 2 H ₂ O
24 mg	NiCl ₂ · 6 H ₂ O
36 mg	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O
ad. 1 L	H ₂ O

Zuerst wurde die Nitrilotriessigsäure in Wasser gelöst und der pH-Wert auf 6 mit NaOH eingestellt. Anschließend wurden die einzelnen Komponenten gelöst.

2.3.4.5 Minimalmedium für *Bacillus*

Das Minimalmedium für *Bacillus* [108] wurde aus folgenden Komponenten hergestellt.

2 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
14 g	K ₂ HPO ₄
6 g	KH ₂ PO ₄
1 g	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O
0,2 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
ad. 920 ml	H ₂ O

Für die Versuche im Abschnitt 3.2.2.1 und 3.4.4 wurde es mit Supplementen nach Shariat *et al.*, 1995 [109] ergänzt.

Supplemente für 1 L Medium

30 ml	Glukose 1 M
10 ml	Casaminosäuren 10% (w/v)
40 ml	KNO ₃ 25 % (w/v)

2.3.4.6 M9-Medium

Beim M9-Medium [107] handelt es sich um ein Minimalmedium. Es wurde aus folgenden sterilisierten Komponenten in einem sterilen Gefäß zusammengesetzt.

200 ml	5x M9-Salzlösung
2 ml	MgSO ₄ (1 M)
20 ml	20% (w/v) C-Quelle
0,1ml	CaCl ₂ (1 M)
100 µl	SL8
100 µl	Vitaminlösung
ad. 979 ml	H ₂ O (steril)

Als C-Quelle wurden 20 ml in Wasser gelöstes und sterilisiertes fettfreies Milchpulver (*Skim Milk Powder*) (20% w/v) verwendet.

5x M9-Salzlösung

64 g	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O
15 g	KH ₂ PO ₄
2,5 g	NaCl
5,0 g	NH ₄ Cl
ad. 1 L	H ₂ O

SL8

5,2 g	Na ₂ -EDTA
1,5 g	FeCl ₂ · 4H ₂ O
70 mg	ZnCl ₂
100 mg	MnCl ₂ · 4H ₂ O
62 mg	H ₃ BO ₃
190 mg	CoCl ₂ · 6H ₂ O
17 mg	CuCl ₂ · 2H ₂ O
24 mg	NiCl ₂ · 6H ₂ O
36 mg	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O
ad. 1 L	H ₂ O

Die SL8-Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Vitaminlösung

50mg	Pantothensäure
50mg	Riboflavin
10mg	Pyridoxamin-HCL
20ml	Biotin
20mg	Folsäure
25mg	Nicotinsäure
25mg	Nicotinsäureamid
50mg	α -Aminobenzoesäure
50mg	Thiamin-HCl
50mg	Vitamin B ₁₂
ad. 1 L	H ₂ O

Die Vitaminlösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

2.3.4.7 Aminosäuremedium für *B. licheniformis*

Das Aminosäuremedium für *B. licheniformis* wurde aus folgenden sterilisierten Komponenten in einem sterilen Gefäß zusammengesetzt.

1 ml	MgSO ₄ (0,5 M)
1 ml	CaCl ₂ (0,1 M)
100 ml	Phosphatpuffer (siehe Mineralmedium für <i>Bacillus</i>)
1 ml	SL9 (siehe Mineralmedium für <i>Bacillus</i>)
100 ml	Glucose (0,5 M)
50 ml	SB-Mix 1
100 ml	SB-Mix 2
100 ml	SB-Mix 3
100 ml	SB-Mix 4
150 ml	SB-Mix 5
ad. 1 L	H ₂ O

SB-Mix 1

3.538 g	L-Alanin
6.012 g	L-Arginin
4.861 g	L-Asparagin-Monohydrat
4.861 g	L-Asparaginsäure
ad. 500 ml	H ₂ O (40 °C)

SB-Mix 2

7.774 g	L-Glutamin
7.774 g	L-Glutaminsäure
3.472 g	Glycin
2.102 g	L-Histidin
3.778 g	L-Isoleucin
ad. 1 L	H ₂ O (40 °C)

SB-Mix 3

6.464 g	L-Leucin
5.306 g	L-Lysin- Monohydrat
1.050 g	L-Methionin
4.110 g	L-Phenylalanin
4.562 g	L-Prolin
4.256 g	L-Serin
3.206 g	L-Threonin
3.990 g	L-Valin
ad. 1 L	H ₂ O (40 °C)

SB-Mix 4

1.104 g	L-Cystein
1.064 g	L-Tryptophan
ad. 1 L	H ₂ O (40 °C)

SB-Mix 5

2.602 g	L-Tyrosin
ad 1.5 L	NaOH (10 mM, 40 °C)

2.3.5 Zellanzucht

2.3.5.1 Aerobe Anzucht

Die aerobe Anzucht von Kulturen erfolgte in Reagenzgläsern mit 4 ml Medium mit Aluminiumkappe oder im Erlenmeyer-Schikanekolben, gefüllt mit 10% bis 20% des Kolbenvolumens. Die Kulturen wurden unter starkem Schütteln mit 150 bis 200 rpm angezogen um eine gute Durchlüftung der Kultur zu gewährleisten. Die Inkubationstemperatur wurde den Bedürfnissen des Experiments angepasst.

2.3.5.2 Anaerobe Anzucht

Die anaerobe Anzucht von Kulturen erfolgte in 100 ml-Serumflaschen, die vollständig mit 100 ml Medium gefüllt und anschließend mit einem Gummistopfen mit Aluminiummantel versiegelt wurden. Das Medium wurde nicht extra anaerobisiert. Da *B. licheniformis* keine Empfindlichkeit gegen Sauerstoff hat und diesen als Elektronenakzeptor verwerten kann, anaerobisierte sich die Kultur selbst. Die Inkubation erfolgte ruhend bei der gewünschten Temperatur.

2.3.6 Stammhaltung

2.3.6.1 *E. coli* und *Bacillus* Kryokulturen

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl sterilem Glycerin (50% (v/v) in H₂O) gut vermischt, 1 min ruhen gelassen und bei -70 °C eingelagert.

2.3.6.2 Sporenplatten

Für die Herstellung von Sporenplatten wurde der gewünschte *Bacillus*-Stamm auf eine SP-Medium-Agarplatte ausplattiert und bis zur vollständigen Austrocknung des Agars bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Die so erstellte Sporenplatte kann bei Raumtemperatur über Jahre aufbewahrt werden. Zur Inokulation von frischen Kulturen mit Sporen wurde 5 µl steriles Wasser unter der Sterilbank auf einer Kolonie der ausgetrockneten Sporenplatte mehrmals auf und ab pipettiert und damit eine neue Kultur inokuliert.

2.3.7 Bestimmung der optischen Dichte

Mittels der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde der Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen verfolgt. Hierfür wurde ein UV-Spektrometer (Ultrospec®3300pro, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) verwendet. Als Referenz diente unbeimpftes Medium. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die Proben ab einem Wert von 0,6 verdünnt.

Bei Kulturen, wo die Entnahme von Material nicht möglich war, wurde die optische Dichte mittels eines Klett-Summerson Photoelectric Colorimeters mit einem Grünfilter (KLETT Mfg. Co. Inc., NY, USA) direkt im Reagenzglas ermittelt. Als Referenz diente ein Reagenzglas mit unbeimpftem Medium.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Methoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid DNA wurden 2 ml einer Übernachtskultur verwendet. Diese wurden in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 17000 g pelletiert und anschließend für die Plasmidpräparation verwendet.

Im Fall einer Plasmidpräparation aus *E. coli* ist das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet worden. Abweichend davon wurde das Plasmid von der Säule mit H_2O eluiert.

Im Fall einer Plasmidpräparation aus *Bacillus* wurde abweichend von den Herstellerangaben, vor der Gabe des P1-Puffer das Pellet in 50 μ l in H_2O gelöstem Lysozym (20 mg/ml) resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Gabe von 200 μ l P1-Puffer wurde weiter nach Herstellerangaben verfahren.

2.4.1.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA von *B. licheniformis* wurde das MasterPure[®]™ DNA Purification Kit (Epicentre, Madison, USA) genutzt. 1 ml einer Übernachtskultur in NB-Medium wurden bei 5000 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 μ l Lysozym (20 mg/ml) resuspendiert und für 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 100 μ l 2 x T&C-Lyse-Lösung mit 1 μ l Proteinase K versetzt und für 15 min

bei 65 °C inkubiert. Die so aufgeschlossenen Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt und mit 1 µl RNaseA versetzt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proteinfällung geschah durch Zugabe und vorsichtigem Mischen von 100 µl MPC Proteinpräzipitationsreagenz. Das gefällte Protein wurde mittels Zentrifugation bei 10000 g für 10 min bei Raumtemperatur sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der DNA wurde der Überstand nach Zugabe von 335 µl Isopropanol (100%, -20 °C) und sorgfältigem Mischen für 10 min bei -20 °C inkubiert und 10 min bei 17000 g zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde zweimal mit 150 µl 75%igen, eiskaltem Ethanol gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst, am nächsten Tag gut gemischt, die Konzentration ermittelt, auf 100 ng/µl eingestellt und im Gel kontrolliert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.4.1.3 Isolierung von Phagen-DNA

Zur Isolierung von Phagen-DNA aus einer Phagensuspension (siehe Kapitel 2.5.1) wurde das MasterPure[®]™ DNA Purification Kit (Epicentre, Madison, USA) genutzt. Zu 100 µl Phagen, gelöst in TMK-Puffer, wurden 100 µl 2 x T&C-Lyse-Lösung mit 1 µl Proteinase K gegeben und 15 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Proteinfällung und weitere Schritte analog zum Protokoll im Kapitel 2.4.1.2.

2.4.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Gewinnung bakterieller Gesamt-RNA wurden die Zellen mit RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben fixiert. Das Fixieren der Zellen soll den RNA-Abbau während des Präparationsprozesses unterbinden. Nach der Zellernte wurde das Zellpellet auf Eis oder bei -20 °C bis zur Verwertung gelagert.

Für den Zellaufschluss wurde der Mikrodismembrator U (B. Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet. Hierfür wurde das Zellpellet in 200 µl H₂O resuspendiert und in das im Flüssigstickstoff vorgekühlte Teflongefäß mit Stallkugel gegeben. Das Teflongefäß wurde verschlossen, in den Mikrodismembrator eingesetzt und die Zellen bei 2000 rpm für 2 min aufgeschlossen. Das nach dem Aufschluss noch gefrorene Zellmehl wurde mit vorbereitetem RTL-Puffer aus dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden,

Deutschland) aufgenommen und für die Herstellung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Hierbei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde wie im Kapitel 2.4.1.6 beschrieben ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

2.4.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als Standard DNA-Polymerase wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Dabei wurde nach Anweisung des Herstellers verfahren. Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen. Zum Reinigen der PCR-Produkte wurde das PCR-Purification Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 24 aufgeführt.

2.4.1.6 Bestimmen der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit dem NanoDrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland), anhand der Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm, bestimmt. Der Nullabgleich erfolgte mit dem Lösungsmittel der DNA. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde direkt von der Ausgabe des Geräts abgelesen. Die Reinheit der DNA wurde wie folgt abgeschätzt. Reine DNA weist ein Absorptionsverhältnis bei 260 zu 280 nm von 1,8 , und bei 260 zu 230 nm von 2,2 auf [107]. Kontamination mit Phenol oder Protein erhöhen die Absorption bei 280 nm, während Polysaccharide für eine erhöhte Absorption bei 230 nm sorgen.

2.4.1.7 Analytische Gelelektrophorese

Für die analytische gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurde die horizontale Elektrophoresekammer Speedy 1 (G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland) verwendet. Die Dichte der Agarose (Biozym LE Agarose, Hessisch Oldendorf, Deutschland) wurde den Bedürfnissen angepasst und lag zwischen 0,5 und 2% (w/v) im TAE-Puffersystem. Die Agarose wurde im 1x TAE-Puffer aufgenommen und in einer Mikrowelle aufgeköcht bis sie sich vollständig gelöst hat. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer mit vorbereitetem Kamm gegossen. Nach Erhärten des Gels wurde diese mit 1x TAE-Puffer überschichtet und 15 min äquilibriert. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Ladepuffer

versetzt. Als Längenstandards wurden 3 µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder oder GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanten 100 V für 1 h bei Raumtemperatur. Nach abgeschlossener Auftrennung wurde das Gel in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 10 min inkubiert und anschließend in voll-entsalztem Wasser 10 min entfärbt. Die Dokumentation der aufgetrennten Nukleinsäuren erfolgte in einer Gel-Dokumentationsanlage (ImageQuant 100, GE Healthcare, Freiburg) unter UV-Licht mit 302 nm.

50 x TAE-Puffer

242 g	Tris base
37,2 g	EDTA
pH 8,0	mit Essigsäure (100%)
ad.	1 L H ₂ O

5 x Ladepuffer Grün

0,1 g	Xylene Cyanol FF
0,1 g	Orange G
50 ml	50% Glycerin (v/v) in H ₂ O

2.4.1.8 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese wurde wie die analytische vorgenommen (siehe Kapitel 2.4.1.7). Die DNA-Bande von Interesse wurde auf dem UV-Tisch mit UV_{365 nm} sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Präparation der DNA aus dem Gelfragment erfolgte unter Benutzung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die Konzentration der DNA wurde bestimmt wie in Kapitel 2.4.1.6 beschrieben.

2.4.1.9 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte mit Fast Digest (FD) Restriktionsenzymen (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) in einem 20 µl-Restriktionsansatz.

Im Falle einer *in vitro* Konstruktion eines Vektors wurde die Reaktion vollständig mit dem PCR-Produkt aufgefüllt (X,Y). Bei Plasmid-DNA wurde maximal 1 µg Plasmid (X) eingesetzt und mit Wasser (Y) aufgefüllt. Soweit nicht anders erforderlich, erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 30 min. Nach dem Restriktionsverdau von Vektor-DNA wurde durch Zugabe von 1 µl FastAP (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) in den Restriktionsansatz der Vektor dephosphoryliert, um eine Religation auszuschließen. Insert-DNA blieb unbehandelt. Nach der Dephosphorylierung wurden die Restriktionsansätze mittels des PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und für die Ligation eingesetzt.

Im Falle eines Kontrollverdaus wurde in einem 10 µl Ansatz mit *Green-FD* Puffer (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) ca. 100 ng DNA verdaut und dabei nur 0,1 µl Enzym eingesetzt. Der Ansatz wurde im Ganzen in ein Agarosegel geladen und das Fragmentmuster mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.4.1.7) überprüft.

Konstruktions-Restriktionsverdau		Kontrollverdau	
2 µl	FD-Puffer	1 µl	Green FD-Puffer
0,5 µl	FD-Enzym A	0,1 µl	FD-Enzym A
0,5 µl	FD-Enzym B	0,1 µl	FD-Enzym B
X µl	DNA (maximal 1 µg)	X µl	DNA (~ 100 ng)
Y µl	ad. 20µl H ₂ O	Y µl	ad. 10 µl H ₂ O

2.4.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurde die T4 DNA-Ligase (5 U/µl, Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Das Pipettierschema ist in Tabelle 5 aufgeführt. Vom Vektor wurden 20-100 ng DNA in die Ligation eingesetzt. Das Insert wurde 3-6 Mal höher konzentriert. Die fertigen Ligationsansätze wurden, eine Stunde ruhend, bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vollständig, ohne weiteres Pipettieren, für die Klonierung benutzt.

Tabelle 5: Pipettierschema für Ligationsansätze

	1	2	Religation
Vektor	20-100 ng	20-100 ng	20-100 ng
Insert	3 fach	6 fach	-
Puffer	2 μ l	2 μ l	2 μ l
T4 Ligase (5 U/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
H ₂ O steril	ad. 20 μ l	ad. 20 μ l	ad. 20 μ l

2.4.1.11 Ligasefreie Erstellung von DNA-Konstrukten

Diese Methode basiert auf Tillett und Neilan 1999 [110]. Die Methode ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Sowohl der Vektor als auch das Insert wurden zweimal mittels PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.1.5). Die Doppelamplifikate unterschieden sich in der Größe. Das größere Fragment hatte oligonukleotid-generierte-Überhänge, komplementär zum Ligationspartner. Alle PCR-Fragmente wurden gereinigt und die Konzentration ermittelt (siehe Kapitel 2.4.1.6). Die vier PCR-Fragmente wurden zu gleichen Teilen vereinigt, wobei die Gesamtmenge der DNA auf 200 ng eingestellt wurde. Der Gesamtansatz wurde anschließend einem Enzymverdau (siehe Kapitel 2.4.1.9) mit *DpnI* Fast Digest (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) unterzogen. Dieses Restriktionsenzym schneidet spezifisch Desoxyadenosin-methylierte DNA (*dam*⁺), was der verwendeten DNA-Matrize entspricht, da diese aus desoxyadenosinmethylasepositiven *E. coli* Top10 stammte. Die durch die PCR generierte DNA ist frei von diesem Methylasemuster und wird dadurch nicht von *DpnI* angegriffen. Auf diese Weise wurde der Ligationsansatz von der PCR-DNA-Matrize befreit, welche potentielle falschpositive Klone in einer Folgeklonierung generieren würde.

Zur Deaktivierung des *DpnI*-Restriktionsenzym und Denaturierung der DNA wurde der Ansatz in einen auf 95 °C erhitzten Heizblock für 2 min inkubiert und der Heizblock anschließend ausgeschaltet, um selbständig mit der Probe auf Raumtemperatur abzukühlen. Während des langsamen Abkühlens konnten alle Fragmente renaturieren, wobei sich zwischen den äquivalenten kurzen und langen Fragmenten Chimäre mit langen Überhängen bildeten. Da die Überhänge des Vektoramplifikats komplementär zu den Überhängen des Inserts waren könnten diese gleichfalls miteinander hybridisieren und ergaben ein Plasmid mit

Einzelstrangbrüchen. Die abgekühlte DNA wurde anschließend ohne weitere Reinigungsschritte, wie in Kapitel 2.4.2.2 beschrieben, in *E. coli* transformiert. Die Einzelstrangbrüche des transformierten Konstrukts wurden vom Vektor-Wirt *E. coli* repariert.

Beim Erstellen von Oligonukleotiden musste darauf geachtet werden, dass die komplementären Überhänge eine Schmelztemperatur deutlich über 42 °C aufwiesen, da sonst beim Hitzeschock der Transformation das gewünschte Konstrukt wieder zerfallen würde.

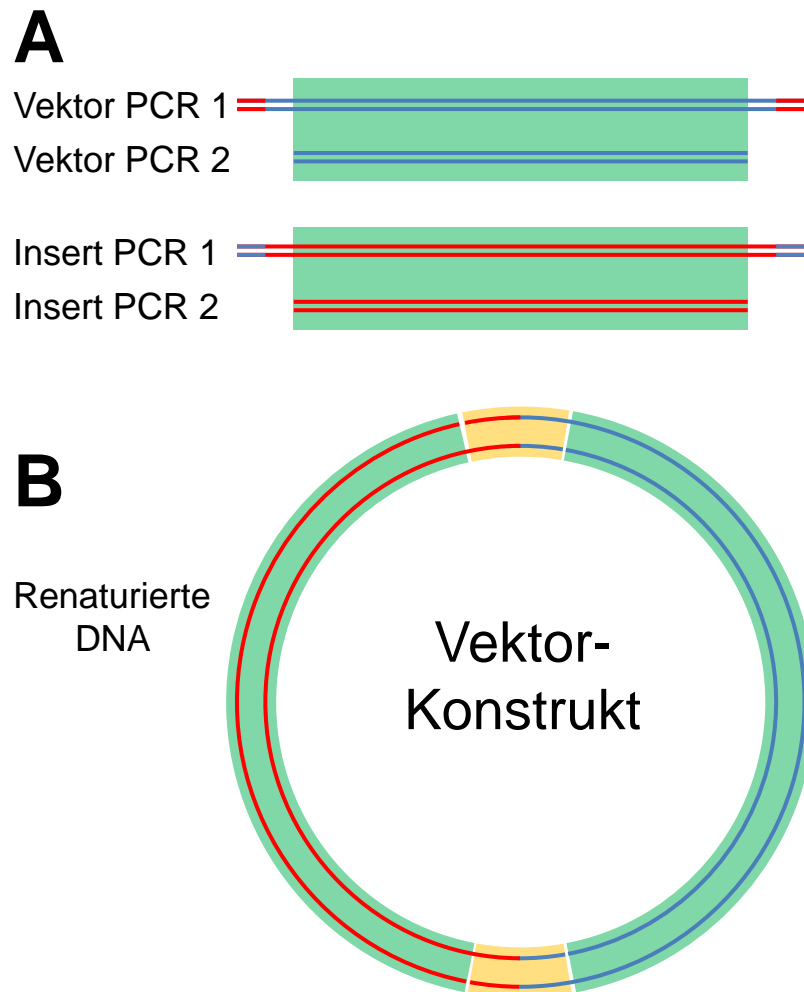


Abbildung 1: Ligasefreie Erstellung von DNA-Konstrukten

Im Abschnitt A sind die zu erstellenden PCR Fragmente dargestellt. Die sequenzidentischen Bereiche der Fragmente sind grün unterlegt. In B ist das Ergebnis der Renaturierung aller PCR generierter DNA Fragmente dargestellt. Durch die Renaturierung der vier vorliegenden PCR-Fragmente entstehen Hybride mit zueinander kompatiblen Einzelstrangüberhängen. Mittels der Hybridisierung dieser Überhänge miteinander bildet sich der dargestellte Vektor. Am Rand der gelb unterlegten hybridisierten Bereiche sind DNA Einzelstrangbrüche vorhanden. Diese werden nach der Transformation vom Host geschlossen.

2.4.2 Transformation von *Bacillus* und *E. coli*

2.4.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wurde eine Übernachtskultur verwendet, um 50 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 einzustellen. Die Kultur wurde bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert und anschließend bei 3500 × g und 0 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und erneut pelletiert. Nach dem Waschen wurde das Pellet in 6 ml eiskaltem Lagerpuffer (25 ml 120 mM CaCl₂ und 10 ml 50% Glycerin) resuspendiert. Die so präparierten Zellen wurden auf Eis portioniert und bei – 80 °C gelagert

2.4.2.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschocks

Kompetente *E. coli* -Zellen (200 µl) wurden auf 10-100 ng Vektor-DNA oder einen 20 µl-Ligationsansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert, danach das Reaktionsgefäß 45-60 sek auf 42 °C erwärmt („Hitzeschock“) und anschließend für 10 min erneut auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen für 20-30 min bei 37 °C inkubiert. Von den Transformationsansätzen wurden jeweils 100 µl und der pelletierte und in 100 µl Überstand resuspendierte Rest auf selektive Agarplatten ausplattiert.

2.4.2.3 Herstellung kompetenter *B. subtilis* 168 Zellen

10 ml MNGE-Medium mit CAA (*Casamino acids* = Säure hydrolysiertes Casein) wurden mit einer *B. subtilis* 168 Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und unter starkem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Die erste Messung erfolgte nach ca. 2 h. Bei einer OD₆₀₀ von 1,3 wurden die Zellen mit gleicher Menge an MNGE-Medium ohne CAA verdünnt. Danach wurden die Zellen für eine weitere Stunde bei 37 °C geschüttelt. Nach dieser Inkubation sind die Zellen genetisch kompetent und können für einen Transformation verwendet werden.

Eine Konservierung für eine spätere Verwendung war möglich. Hierfür wurden die genetisch kompetenten Zellen bei 4000 g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein steriles Gefäß dekantiert. Das Pellet wurde in 1/8 des Überstandes resuspendiert und eine Glycerinkonzentration von 10 %

eingestellt. Aliquots (300 μl) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

MNGE-Medium

9,2 ml	1x MN-Medium
1 ml	Glukose (20% w/v)
50 μl	Kaliumglutamat (40% w/v)
50 μl	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml ⁻¹)
100 μl	Tryptophan (5 mg ml ⁻¹)
30 μl	MgSO ₄ (1 M)
+/-100 μl	CAA (10% w/v)

10 × MN-Medium

136 g	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O
60 g	KH ₂ PO ₄
10 g	Natriumcitrat · 2H ₂ O
ad. 1 L	H ₂ O

2.4.2.4 Transformation kompetenter *B. subtilis*-Zellen

Die bei -70°C gelagerten kompetenten Zellen (300 μl) wurden im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und mit vorpipettierten Lösungen (1,7 ml 1 x MN-Medium (siehe Kapitel 2.4.2.3), 43 μl 20 % Glukose und 34 μl 1 M MgSO₄) versetzt. Zu 400 μl dieser Zellsuspension, oder 400 μl frischer Zellen, wurden 0,1-1 μg DNA gegeben und 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Anschließend erfolgte die Gabe von 100 μl Expressionslösung (500 μl Hefeextrakt (5 % w/v), 250 μl CAA (10 % w/v), 250 μl H₂O, 50 μl Tryptophan (5 mg/ml), 5 μl Antibiotikum (finale Konzentration entspricht 1/100 der Selektionskonzentration) und die Inkubation für weitere 60 min schüttelnd bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Im finalen Schritt wurden die Zellen auf Selektions-Agarplatten ausplattiert.

2.4.2.5 Konjugation von Plasmiden von *E. coli* zu *Bacillus*

Die Hauptkulturen der zu konjugierenden Stämme wurden mittels einer in LB-Medium angezogenen Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in LB-Medium eingestellt und abhängig vom verwendeten Vektor bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter

starkem Schütteln angezogen. Nach etwa 2 h wurde das Wachstum der Kulturen kontrolliert und bei Erreichen der OD_{600} von etwa 0,9 bis 1,1 die Kulturen für die Konjugation verwendet.

Zuerst wurden 2 ml der Donorkultur (*E. coli* S17-1 mit Plasmid) pelletiert (1 min, 8000 g), der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet 2 ml Akzeptorkultur pipettiert und (*Bacillus*) erneut durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 200 μ l LB-Medium resuspendiert und auf eine LB-Platte ohne Antibiotika pipettiert, der Tropfen unter der Sterilbank angetrocknet und 3 h bei 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubation fand die konjugative Übertragung des Plasmids statt. Nach Beendigung der Konjugation wurde das bakterielle Material mit 2 ml LB-Medium von der Agarplatte gewaschen, in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in diesem gut resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 μ l und der pelletierte, in 100 ml Überstand resuspendierte Rest auf selektive NB-Agarplatten mit Kanamycin (25 μ g/ml) und Polymyxin B (20 μ g/ml) ausplattiert. Das Polymyxin B wirkt antimikrobiell gegen gramnegative Bakterien und ermöglicht die gezielte Anzucht von *Bacillus* aus einem *Bacillus* - *E. coli* Gemisch.

2.4.2.6 Erzeugen von Mutationen in *B. licheniformis* [66]

Für das Erzeugen von markerfreien Deletionen in *B. licheniformis* wurde das pKVM-System von Rachinger *et al.*, 2013 [66] benutzt. Hierfür wurde eine Deletionskassette mittels PCR erzeugt, die aus zwei fusionierten Sequenzfragmenten bestand, welche ihrerseits den zu deletierenden DNA-Bereich flankierte. Diese Kassette wurde in einen pKVM-Vektor kloniert und dieser mittels *E. coli* S17-1 konjugativ auf *B. licheniformis* übertragen (siehe Kapitel 2.4.2.5). In Abbildung 2 ist das Erstellen eines pKVM-Deletionsvektors schematisch dargestellt. Es war zu beachten, dass der pKVM-Vektor nur bei 30 °C in *B. licheniformis* replizieren kann. Zog man den *B. licheniformis* mit den pKVM-Deletionskonstrukt und Selektionsdruck bei 42 °C an, so war der Organismus gezwungen den Vektor mittels Campbell-Integration [111] in einen homologen Bereich im Chromosom zu integrieren, wofür eine der beiden Flanken der Deletionskassette benutzt wurde. Zog man den Stamm mit der Vektorintegration erneut bei 30 °C unter nicht selektiven Bedingungen an, so konnte der Vektor vom Wirt aus dem Chromosom mittels homologer Rekombination entfernt werden, wobei eine der beiden Flanken dafür benutzt

wurde. Im Falle eines solchen Ereignisses enthielten 50% der Rekombinanten den gewünschten Genotyp. Um einen pKVM-Konstrukt-freien Stamm zu identifizieren, wurde der Stamm mit der Vektorintegration mehrmals bei 30 °C unter nicht selektiven Bedingungen passagiert. Von diesen Passagen wurden Verdünnungsstufen erstellt und auf NB-Agarplatten mit 50 mM Glukose und 0,008% X-Gal ausplattiert, mit dem Ziel Einzelklone zu erhalten. Systembedingt sollten auf diesen Platten Klone ohne ein pKVM-Konstrukt eine hellere Blaufärbung aufweisen als Klone, die immer noch ein pKVM-Konstrukt beherbergten. Von diesen Platten wurden bevorzugt hellere Klone gepickt und auf eine nicht selektive NB-Agarplatte und eine selektive NB-Agarplatte ausgebracht. Enthielt der Klon kein pKVM-Konstrukt mehr, so konnte dieser nicht auf der selektiven NB-Agarplatte wachsen und war noch von der nicht selektiven NB-Agarplatten verfügbar. Ob der pKVM-Konstrukt-freien Klone die gewünschte genetische Modifikation enthielten, wurde durch Amplifizieren der betreffenden genomischen Region mittels PCR (siehe Kapitel 2.4.1.5) und anschließender Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert oder mittels einer *Southern Blots* (siehe Kapitel 2.4.4) überprüft.

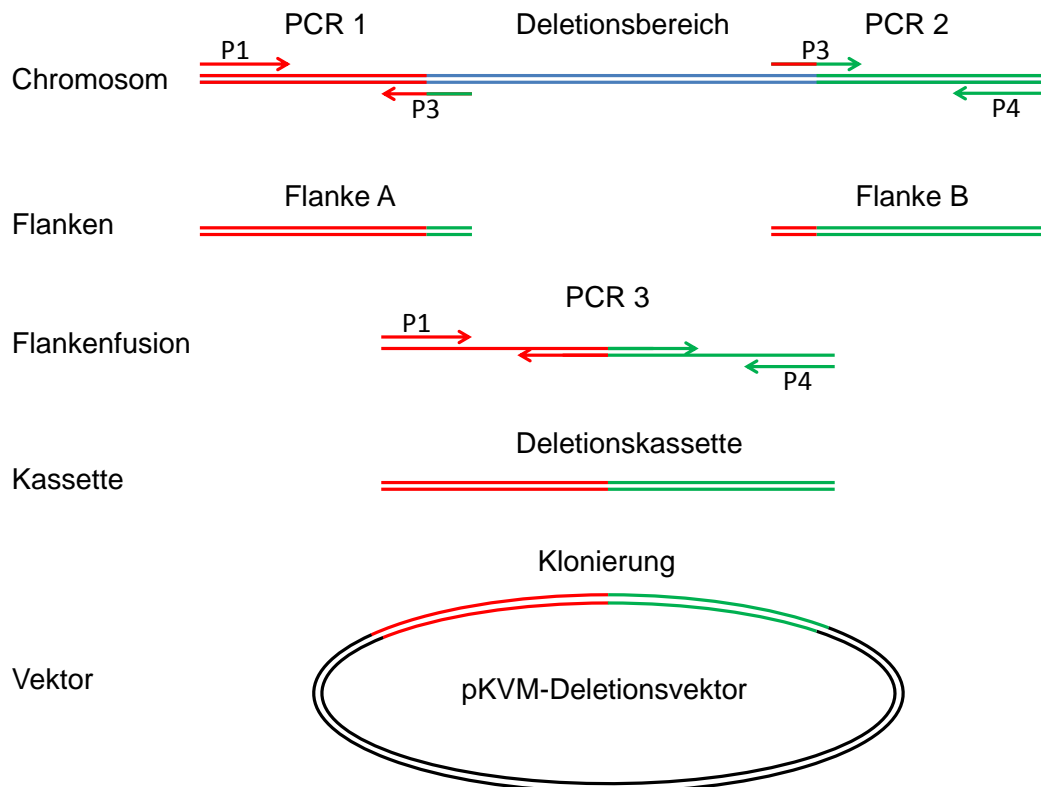


Abbildung 2: Schema der Erstellung eines pKVM-Deletionsvektors

Die einzelnen Arbeitsschritte sind von oben nach unten aufgeführt. P1 bis P4 symbolisieren die benötigten Oligonukleotide. In rot und grün sind die Flanken der Deletionskassette dargestellt.

2.4.3 Methoden zum Arbeiten mit Proteinen

2.4.3.1 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in *Bacillus*

Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde in Anlehnung an Miller (1972) [112] durchgeführt: Die Messung beruht auf folgender enzymatisch katalysierten Reaktion: o-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid wird durch die β -Galaktosidase in o-Nitrophenol (gelb, Absorptionsmaximum bei 420 nm) und Galaktosidase gespalten. Der Anstieg der Konzentration des Spaltungsprodukts o-Nitrophenol wurde photometrisch bei OD_{420} bestimmt und dadurch die relative β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt. Für jeden Stamm und jeden Effektor wurde die β -Galaktosidase-Aktivität mindestens dreimal unabhängig voneinander gemessen.

Durchführung

1. Übernachtskulturen wurden von *Bacillus*-Stämmen im entsprechenden Medium mit Kontrollen angeimpft. Die OD₆₀₀ der Vorkulturen wurde am Morgen bestimmt.
2. Die Hauptkultur wurde in 10 bis 20 ml Medium (mit oder ohne Effektor) in 100 ml Erlenmeyer-Schikanekolben auf einer OD₆₀₀ von ca. 0.1 mit der Vorkultur eingestellt.
3. Die Stämme wurden bei einer für die Fragestellung entscheidenden Temperatur angezogen und Proben bei gewünschten Zeitpunkten gezogen, wobei das Probenvolumen an die Dichte der Kultur angepasst wurde (2 h = 2 ml, 4 h = 1 ml, 6 h = 0,5 ml, 8 h = 0,25 ml, 10 h = 0,1 ml). Diese wurden 5 min mit 8000 g bei 4 °C zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets bis zur Ernte aller Kulturen auf Eis gestellt oder bei -20 °C eingelagert.
4. Die Pellets wurden in 400 µl Z-Puffer (mit β-Mercaptoethanol (35 µl β-Mercaptoethanol auf 10 ml Z-Puffer) und LD-Mix (50 µl LD-Mix auf 10 ml Z-Puffer) resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Als Referenz diente ein leeres Eppendorfgefäß, welches die gleiche Behandlung durchlief. (10 ml Puffer für 25 Proben).
5. Die Ansätze wurden 2 min bei 4 °C und 17000 g zentrifugiert.
6. Die Zellextrakte (Überstände) wurden in neue Eppendorfgefäße gegeben.
7. 100 µl des Zellextraktes wurde in 700 µl Z-Puffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und 5 min bei 28 °C inkubiert (20 ml Puffer für 25 Proben).
8. Der Start der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Zugabe von 200 µl ONPG (4 mg/ml in 1 x Z-Puffer ohne β-Mercaptoethanol). Der Zeitpunkt der Zugabe wurde festgehalten.
9. Sobald eine Gelbfärbung zu sehen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Na₂CO₃ (1 M) gestoppt. Der Zeitpunkt der Zugabe von Na₂CO₃ wurde notiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 420$ nm gemessen. Als Referenz diente ein identisch behandelte Ansatz ohne Zellextrakt.
10. Für die Auswertung war die Bestimmung des Proteins im Zellextrakt notwendig. Diese erfolgte nach Bradford [113], wobei 20 µl des Proteinextraktes ausreichend waren. Hierfür wurde vor dem Messen

200 µl 5x Roti-Quant von Carl-Roth mit 780 µl Wasser gemischt, mit 20 µl Zellextrakt versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Leerwert diente eine gleich behandelte Probe mit 20 µl Z-Puffer mit LD-Mix. Die Bestimmung der Absorption bei der Proteinmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Da das Roti-Quant von Carl-Roth sehr stabil ist, wurde auf die Standardreihe verzichtet und die vereinfachte Formel mit einem integrierten Faktor für die Berechnung verwendet.

Die β -Galaktosidase-Aktivität [Units/mg Protein] wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

Units/mg Protein =

$$(1500 \times A_{420}) / (\Delta t \times V \times A_{595} \times 1.7 \times 4.4) \approx (2000 \times A_{420}) / (\Delta t \times A_{595})$$

Vereinfachte Formel:

$$(A_{420} / (\Delta t \text{ min} \times A_{595})) \times 2005,3475$$

A420: Absorption von o-Nitrophenol

Δt : Zeitdifferenz zwischen Reaktionsstart und –stopp in Minuten

V: Volumen des Zellextraktes in ml

A595 x 1.7: Proteingehalt des Zellextraktes in mg/ml

LD-Mix: 100 mg Lysozym wurden in 10 ml H₂O gelöst und 10 mg DNase I hinzugegeben. Die Enzymlösung wurde bei -20 °C gelagert.

Z-Puffer

60 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O

40 mM NaH₂PO₄ · H₂O

10 mM KCl

nach dem Autoklavieren sterile Zugabe von

1 mM MgSO₄

Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol wurde nicht gelagert und immer frisch hergestellt.

ONPG: 4 mg/ml in 1 x Z-Puffer ohne β -Mercaptoethanol

ONPG wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Es wurde verwendet so lange es farblos war.

Abstopplösung: 1 M Na_2CO_3

2.4.3.2 Ermittlung der Exoproteaseaktivität

Die Exoproteaseaktivität wurde kolorimetrisch mittels Sigmas nicht spezifischen Proteaseaktivitätstest mit Casein als Substrat bestimmt [114]. Dafür wurde von den zu untersuchenden Stämmen eine Vorkultur über Nacht in 4 ml LB-Medium angezogen. Am Morgen wurde die OD_{600} ermittelt und der Teil in einem 2 ml Eppendorfgefäß pelletiert, der für das einstellen von 4 ml Kultur auf eine OD_{600} auf 0,1 nötig ist. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml mit Milchpulver supplementiertem M9-Medium (siehe Kapitel 2.3.4.6) resuspendiert und in ein Reagenzglas mit 3 ml gleichem Medium gegeben. Die Inkubation der Kultur erfolgte unter starkem Schütteln bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 24 h. Anschließend wurde 1 ml der Kultur bei 17000 g für 1 min pelletiert und im Überstand die Exoproteaseaktivität bestimmt.

2.4.4 DNA-DNA-Hybridisierung (*Southern Blot*)

Mittels des *Southern Blots* können spezifische DNA-Fragmente in der Gesamtheit einer verdauten chromosomalen DNA mittels einer markierten sDNA-Sonde untersucht werden.

2.4.4.1 Herstellung einer biotinmarkierten DNA-Sonde

Zur Herstellung der biotinmarkierten DNA-Sonden wurde das Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das Kit beinhaltet alle notwendigen Bestandteile.

Reaktionsansatz

10 μl	Decanucleotide in 5 x Reaktionspuffer
1 μg	gereinigtes PCR-Produkt als DNA-Matrize
ad. 44 μl	nukleasefreies Wasser

Der Voransatz wurde für 10 min auf dem Heizblock bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Hierbei erfolgte die Anlagerung der Decanucleotide an die DNA-Matrize. Anschließend wurden folgende Bestandteile zugesetzt.

6 µl	Biotin Labeling Mix
1 µl	Kleenow-Fragment, exo^- (5 u)

Der finale Reaktionsansatz wurde über Nacht (~16 h) bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde durch das Kleenow-Fragment die biotinmarkierte DNA synthetisiert. Am nächsten Morgen wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 die Reaktion abgestoppt. Nach Abschluss der Reaktion enthielt der Ansatz einzelsträngige biotinmarkierte DNA-Fragmente, die als Sonde verwendet wurden. Diese wurde bei -20 °C gelagert.

2.4.4.2 Auftrennung der DNA im Agarosegel

Die für ein 1% Gel notwendige Menge an Agarose (Biozym LE Agarose, Hessisch Oldendorf, Deutschland) wurde im 1x TAE-Puffer aufgenommen (siehe Kapitel 2.4.1.7) und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie sich vollständig gelöst hat. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer (HE33 Mini Horizontal Agarose Unit, Hoefer, Holliston, USA) mit vorbereitetem Kamm gegossen. Nach Erhärten des Gels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer überschichtet und für 15 min äquilibriert.

Von der zu analysierenden chromosomalen DNA wurden 3 µg mit der gewünschten Endonuklease verdaut und vollständig in eine Tasche des vorbereiteten Gels übertragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für 1 h. Als Marker wurden 10 µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Nach Abschluss des Laufs wurden die Geltaschen mit 1,5% TAE-Agarose versiegelt, das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert (siehe Kapitel 2.4.1.7).

2.4.4.3 Übertragung der DNA auf eine Membran

Für die Übertragung der DNA aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Basel, Schweiz) wurde eine Vakuumapparatur (785 Vacuum Blotter, Hercules, USA) benutzt. Die Membran wurde zugeschnitten und unter der Maske platziert, dabei überlappte diese die Membran an jeder Seite etwa 5 mm. Der Transfersog betrug konstante 5 mmHg. Auf das Gel wurde zuerst für 30 min Depurinisationspuffer gegeben. Anschließend wurde dieser durch Kippen der Apparatur vorsichtig mit einer Spritze abgenommen und für weitere 30 min mit Denaturierungspuffer überschichtet. Darauf folgte eine 30 min Überschichtung mit Neutralisationspuffer und abschließend der Transfer für 3 h mit 20x SSC. Nach der Übertragung der DNA auf die Nylonmembran wurde diese vorsichtig freigelegt und für 90 sec mit der DNA-beinhaltenden Seite zum UV-Tisch bei 302 nm fixiert.

Depurinisationspuffer

0,25 M HCl

Denaturierungspuffer

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

Neutralisationspuffer

0,5 M Tris-HCl pH 7,5

3 M NaCl

20x SSC

3 M NaCl

0,3 M Na₃-Citrat pH 7,0

Diese Puffer wurden autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.4.4 Hybridisierung der DNA-Sonde

Für die Hybridisierung der biotinmarkierten sDNA-Sonde wurde die Membran mit der DNA-tragenden Seite nach innen in ein 50 ml Reaktionsröhrchen gegeben und mit 25 ml Prähybridisierungslösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte in einem Hybridisierungsröhrchen (Ochs, Bovenden, Deutschland) für 2 h bei 68 °C, wendend in einem Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen). Anschließend wurde dem Ansatz der vollständige Sondenansatz (siehe Kapitel 2.4.4.1) zugegeben, der zuvor bei 98 °C für 5 min denaturiert wurde. Die Inkubation der Membran mit der Sonde erfolgte für weitere 16 h bei 68 °C. Anschließend wurde die Sonde abgenommen und die Membran zweimal 15 min mit Puffer P1 bei RT und zweimal 15 min mit Puffer P2 bei 68 °C gewaschen.

Prähybridisierungslösung

12,5 ml	20x SSC (siehe Kapitel 2.4.4.3)
5,0 ml	10% Blocking-Stammlösung
0,5 ml	10% (w/v in H ₂ O) N-Lauroylsarcosin
0,1 ml	10% (w/v in H ₂ O) SDS
ad. 50 ml	H ₂ O

Lösung wurde aus sterilen Komponenten zusammengesetzt und bei -20 °C gelagert.

Blocking Stammlösung (10%)

10 g	Blocking Reagent
ad. 100 ml	Maleinsäurepuffer

Lösung wurde aus sterilen Komponenten zusammengesetzt und bei 4 °C gelagert.

Maleinsäurepuffer

0,1 M	Maleinsäure
0,15 M	NaCl
0,175 M	NaOH
ad. 800 ml	H ₂ O

Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer 1

80 ml	20x SSC (siehe Kapitel 2.4.4.3)
8 ml	10% SDS
ad. 800 ml	H ₂ O

Puffer wurde aus sterilen Komponenten zusammengesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer 2

4 ml	20x SSC (siehe Kapitel 2.4.4.3)
8 ml	10% SDS

Puffer wurde aus sterilen Komponenten zusammengesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.4.5 Kolorimetrische Detektion der DNA-Sonde

Die Detektion der biotinmarkierten Sonde erfolgte unter Benutzung des Biotin Chromogenic Detection Kits (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die dafür notwendigen Reagenzien lagen dem *Kit* bei. Ein Konjugat bestehend aus Streptavidin und einer alkalischen Phosphatase ermöglichte den Nachweis der Sonden-Ziel-DNA-Bindung, da das Streptavidin an das Biotin band. Die mit Streptavidin assoziierte alkalische Phosphatase konnte daraufhin das Substrat BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) umsetzen, was zu einer Farbreaktion führte.

2.4.5 RNA-RNA-Hybridisierung (*Northern Blot*)

Mittels des *Northern Blots* können spezifische RNA-Fragmente, in der Gesamtheit der Gesamt-RNA einer Zelle, mittels einer Digoxigenin (DIG)-markierten sRNA-Sonde, untersucht werden.

Für alle folgenden Arbeiten sollte RNase freies Wasser und Chemikalien verwendet werden, sowie doppelt autoklaviertes Material, wie beispielsweise Pipettenspitzen.

2.4.5.1 Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde

Die Herstellung der DIG markierten RNA-Sonde erfolgte unter Verwendung des DIG Northern Starter Kit (Roche, Basel, Schweiz). Zunächst wurde die notwendige DNA-Matrize mittels PCR-Amplifikation (siehe Kapitel 2.4.1.5) hergestellt. Das reverse Oligonukleotid sollte um die Promotorsequenz der T7-RNA-Polymerase erweitert werden (5' CTAATACGACTCACTATAGGGAGA-Oligonukleotid 3') um dieser später *in vitro* die Transkription zu ermöglichen. Das PCR-Produkt kann nach der Aufreinigung für den *in vitro*-Ansatz, zur Synthese der DIG-markierten RNA-Sonde, eingesetzt werden.

20 µl T7-RNA-Polymerase Transkriptionsansatz

9 µl	PCR-Produkt (200 – 400 ng)
4 µl	5 x DIG RNA Labeling Mix
4 µl	5 x Transkriptionspuffer
2 µl	T7-RNA-Polymerase
1 µl	RNase Inhibitor

Der T7-RNA-Polymerase Transkriptionsansatz wurde für 1 h bei 42 °C im Heizblock inkubiert, anschließend auf 37 °C neu eingestellt (Probe im Block belassen), nach Erreichen der Temperatur wurden dem Gesamtansatz 2 µl DNase I (DNase I RNase frei, Roche, Basel, Schweiz) zugesetzt und weitere 15 min bei 37 °C inkubiert, um die DNA-Matrize zu beseitigen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 und 2,5 µl 4 M LiCl gestoppt und durch Zugabe von 75 µl Ethanol (-20 °C) eine Stunde bei -70 °C die RNA gefällt. Im Anschluss wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min, 17000 g, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet mit 50 µl 70 % Ethanol (v/v in H₂O) gewaschen und erneut mit gleichen Parametern zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl RNase freiem Wasser und 1 µl RNase Inhibitor (Roche, Basel, Schweiz) aufgenommen. Vor der Einlagerung bei -70 °C, wurde die RNA für mehrere Stunden bei 4 °C gelöst.

2.4.5.2 Auftrennung der Gesamt-RNA

Die gewonnene Gesamt-RNA (siehe Kapitel 2.4.1.4) wurde in zwei unterschiedlichen Gelsystemen aufgetrennt. Das MOPS-Formaldehyd-Agarose-Gelsystem eignet sich für die Betrachtung von RNA-Fragmenten der Größe 0,1 bis 10 kb und das TBE-Harnstoff-Polyacrylamid-Gelsystem für RNA-Fragmente der Größe 0,05 bis 0,6 kb.

MOPS-Formaldehyd-Agarose-Gelsystem

Für das MOPS-Formaldehyd-Agarose-Gelsystem wurde die Biozym LE Agarose (Hessisch Oldendorf, Deutschland) verwendet. Für ein 1% Gel wurde 1 g Agarose mit 72 ml H₂O in einem 300 ml Erlenmeyerkolben aufgenommen und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Anschließend

wurden 10 ml 10 x MOPS und 18 ml Formaldehyd zugegeben, wobei immer vorsichtig gemischt wurde, um Verklumpung zu verhindern. Anschließend wurde das Gemisch in eine vorbereitete Gelkammer (PerfectBlue Gelsystem Mini M, Paqlab, Erlangen) mit einem 10ner Kamm gegossen und unter dem Abzug ausgehärtet, mit 1x MOPS überschichtet und über Nacht bei +4 °C äquilibriert.

Als Marker wurde 5 µl vom RiboRuler High Range RNA-Ladder (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Der mit dem Marker mitgelieferte 2 x RNA Ladepuffer wurde auch für die Gesamt-RNA Proben verwendet. Die Proben wurden auf Eis vorbereitet. Die 5 µg Gesamt-RNA wurden mit RNase freiem H₂O auf 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl 2 x RNA Ladepuffer versetzt. Sobald alles zusammengegeben war, wurde die Probe für 15 min bei 65 °C denaturiert und anschließend kurz im eisgekühlten Metallblock gekühlt und ins vorbereitete Gel geladen.

Das Gel lief mit konstanten 100 V bis die untere Bromphenol-Bande zwei Drittel durchschritten hat. Nach Abschluss des Laufs wurde das Gel dokumentiert (siehe Kapitel 2.4.1.7) und für den Transfer der Gesamt-RNA auf positiv geladene Nylonmembran verwendet.

10 x MOPS

0,2 M	MOPS
0,05 M	Natriumacetat-Trihydrat
0,01 M	EDTA
pH 7	mit NaOH einstellen
ad. 1 L	H ₂ O

Der MOPS-Puffer wurde nicht autoklaviert sondern mit autoklaviertem Wasser angesetzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

TBE-Harnstoff-Polyacrylamid-Gelsystem

Für dieses Gelsystem wurde die vertikale Gelkammer Mini-Protean (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Die RNA-Gelelektrophorese wurde in einem 8% Polyacrylamid (PAA) Gel mit 7 M Harnstoff in einem 1 x TBE-Puffersystem mit 8 V/cm für eine Stunde durchgeführt. Als Marker wurde der RiboRuler Low Range RNA Ladder 100-1000 bp (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der mit dem Marker mitgelieferte Ladepuffer wurde auch für die Gesamt-RNA-Proben verwendet.

8% PAA 7 M Harnstoff Gel

6,3 g	Harnstoff
3 ml	Acrylamid 40% (19:1 Acrylamid/Bis-Lösung)
1,5 ml	10 x TBE-Puffer
5,25 ml	H ₂ O
150 µl	10% APS (w/v in H ₂ O)
3 µl	Temed

10 x TBE-Puffer

108 g	TRIS Base
55 g	Borsäure
7 g	EDTA-Na ₂
ad. 1 L	H ₂ O

2.4.5.3 Übertragung der Gesamt-RNA auf eine Membran

Abhängig vom Gelsystem wurden zwei unterschiedliche Techniken zur Übertragung der aufgetrennten Gesamt-RNA, auf die positiv geladene Nylonmembran (Roche, Basel, Schweiz), verwendet. Für die Übertragung aus einem MOPS-Formaldehyd-Agarose-Gel wurde eine vakuumbasierte Methode verwendet und für ein TBE-Harnstoff-Polyacrylamid-Gel eine auf elektrischer Spannung basierte Methode eingesetzt.

Vakuum-Blot

Der Transfer der Gesamt-RNA aus einem MOPS-Formaldehyd-Agarose-Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Basel, Schweiz) erfolgte mittels einer VacuGene XL Vacuum Blotting System Apparatur (GE Healthcare Live Sciences, Freiburg, Deutschland). Die Membran wurde zugeschnitten und unter der Maske platziert, dabei muss diese die Membran von jeder Seite mit etwa 5 mm überlappen. Der Transfersog betrug konstante 70 mbar Vakuum. Auf das Gel wurde zuerst für 5 min die Denaturierungslösung gegeben. Anschließend wurde diese durch Kippen der Apparatur vorsichtig mit einer Spritze abgenommen und das Gel für weitere 5 min mit Neutralisierungslösung überschichtet. Diese wurde gleichfalls abgenommen und es folgte eine Überschichtung des Gels für 5 h mit 20x SSC. Nach der Übertragung der DNA auf die Nylonmembran wurde diese vorsichtig freigelegt und für 90 sec mit der DNA-beinhaltenden Seite zum UV-Tisch bei 302 nm fixiert.

Denaturierungslösung

50 mM	NaOH
10 mM	NaCl

Neutralisierungslösung

100 mM	Tris/HCl pH 7,4
--------	-----------------

20x SSC (entspricht SSC aus Kapitel 2.4.4.3)

3 M	NaCl
0,3 M	Na ₃ -Citrat pH 7,0

Diese Puffer werden autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Elektro-Blot

Die Übertragung der Gesamt-RNA aus einem TBE-Harnstoff-Polyacrylamid-Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Basel, Schweiz) erfolgte nach der „semi dry“ Methode [107] unter Verwendung des PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloppers SEDEC M (Peqlab, Erlangen, Deutschland). Als Puffersystem wurde 0,5 x TBE (siehe Kapitel 2.4.5.2) eingesetzt. Der Blot erfolgte für 1 h bei 15 V. Ein schematischer Aufbau eines Elektroblots ist in Abbildung 3 dargestellt.

Nach der Übertragung der DNA auf die Nylonmembran wurde diese vorsichtig freigelegt und für 90 sec mit der DNA-beinhaltenden Seite zum UV-Tisch bei 302 nm fixiert.

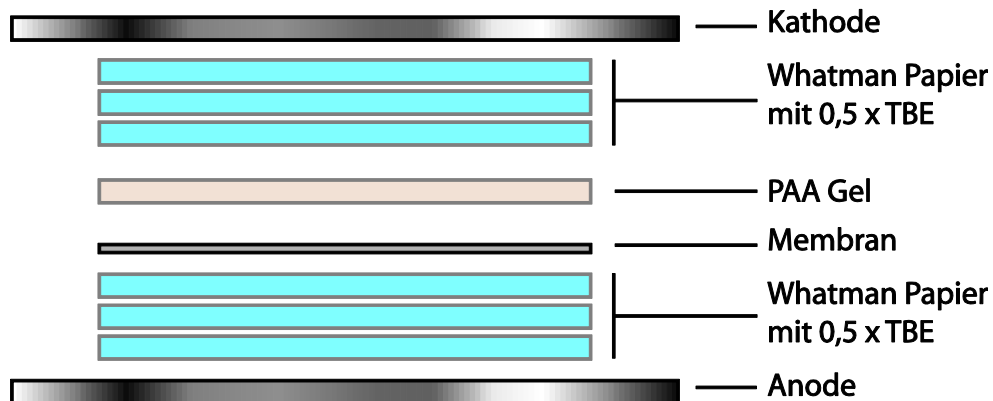


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Elektroblots

Die einzelnen Bestandteile des Blots sind in der Abbildung beschriftet. Die Elektronen fließen von der Kathode zur Anode und transferieren dabei die negativ geladene Nukleinsäure auf die positiv geladene Nylonmembran.

2.4.5.4 Hybridisierung der RNA-Sonde

Die Membran mit der fixierten Gesamt-RNA wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt, mit 20 ml Prähybridlösung versetzt und für 1 h bei 68 °C im Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridlösung verworfen, in das Hybridisierungsröhrchen (Ochs, Bovenden, Deutschland) die vorbereitete Sonde gegeben und über Nacht weiter bei 68 °C gewendet. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgenommen und die Membran zweimal je 5 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer 1 gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschrte je 15 min bei 68 °C mit Waschpuffer 2. Nach dem Waschen wurde die Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen genommen und in eine Schale gegeben. Alle weiteren Arbeitsschritte der Detektion sind bei Raumtemperatur erfolgt.

Vorbereitung der DIG-markierten RNA-Sonde

Von der bei -20 °C eingelagerten Sonde (siehe Kapitel 2.4.5.1) wurden 10 µl in 5 ml Prähybridlösung gegeben und für 10 min in einem Wasserbad aufgeköcht, anschließend 30-60 sec auf Eis abgekühlt und auf die prähybridisierte Membran gegeben.

Prähybridlösung

200 ml	Formamid
100 ml	20x SSC (siehe Kapitel 2.4.4.3)
4 ml	10% N-Lauroylsarcosin
8 g	Blocking Reagent
28 g	SDS
ad. 400 ml	H ₂ O

Die Prähybridlösung wurde nicht autoklaviert, sondern bei -20 °C gelagert.

Waschpuffer 1

100 ml	20x SSC (siehe Kapitel 2.4.4.3)
10 ml	10% SDS
ad. 1 L	H ₂ O

Der Waschpuffer 1 wurde nicht autoklaviert, sondern aus sterilen Komponenten zusammensetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

Waschpuffer 2

5 ml	20x SSC (siehe Kapitel 2.4.4.3)
10 ml	10% SDS
ad. 1 L	H ₂ O

Der Waschpuffer 2 wurde nicht autoklaviert, sondern aus sterilen Komponenten zusammensetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.5.5 Photometrische Detektion der RNA-Sonde

Die Membran mit der hybridisierten DIG-markierten RNA-Sonde wurde in einer Schalle 5 min mit Puffer 1 gewaschen und anschließend für 30 min mit Puffer 2 abgeblockt. Es folgten 30 min Inkubation mit dem Anti-DIG-Antikörper (Roche, Basel, Schweiz) mit einer gebundenen Alkalischen Phosphatase, der 1:10000 in Puffer 2 gelöst wurde. Anschließend wurde die Membran dreimal je 10 min mit Puffer 1 TW gewaschen und 5 min in Detektionspuffer zur Erhöhung des pH-Wertes inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf eine durchsichtige Folie gelegt, mit dem Chemilumineszenz-Substrate CDP-StarTM (Roche, Basel, Schweiz) versetzt, mit einer zweiten durchsichtigen Folie abgedeckt, im Chemilumineszenz-System ChemiSmartTM 5000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) das Signal detektiert und der Blot dokumentiert.

Puffer 1

0,1 M	Maleinsäure
0,15 M	NaCl
7,2 g	NaOH
900 ml	H ₂ O
pH 7,5	mit NaOH einstellen
ad. 1 L	H ₂ O

Dieser Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer 2

5 ml	10% Blocking
ad. 50 ml	Puffer 1

Dieser Puffer wurde immer frisch angesetzt und nicht gelagert.

10% Blocking

10 g	Blocking Reagent
100 ml	Puffer 1

Dieser Lösung wurde nicht autoklaviert und bei -20 °C gelagert.

Puffer 1 TW

0,1 M	Maleinsäure
0,15 M	NaCl
7,2 g	NaOH
3 ml	Tween 20
900 ml	H ₂ O
pH 7,5	mit NaOH einstellen
ad. 1 L	H ₂ O

Dieser Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Detektionspuffer

0,1 M	Tris/HCl pH 9,5
0,1 M	NaCl
ad. 1 L	H ₂ O

Dieser Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.6 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierung diente der Verifikation aller erstellten Plasmide und Mutanten. Hierfür wurde 200 ng Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.4.1.1) oder PCR-Produkt (siehe Kapitel 2.4.1.5) einer zu verifizierenden Mutante mit 5 pmol Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 5 µl zum Sequenzieren im Göttinger Genomlabor (G2L, Göttingen, Deutschland) abgegeben. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger [115]. Hierbei werden farbmarkierten ddNTPs anstelle von dNTPs bei einer PCR Reaktion eingebaut und führen zum Abbruch der Reaktion. Die unterschiedlich langen farblich markierten Fragmente wurden chromatographisch in einem Kapillarsequenzierer 3730XL DNA Analyzer (ABI Applied Biosystems, Foster City, USA) der Größe nach aufgetrennt und detektiert. Sequenzen wurden mit Seqman 5.07 (DNASTAR, Medison, USA) ausgewertet.

Weiterhin wurde mittels der Sequenzierung von Prophagen-DNA und Analyse dieser Sequenzen die Herkunft dieser DNA im Genom von *B. licheniformis* DSM13 ermittelt. Hierfür wurde Phagen-DNA (siehe Kapitel 2.4.1.3) isoliert und zum Sequenzieren im Göttinger Genomlabor (G2L, Göttingen, Deutschland) abgegeben. Die Sequenzierung erfolgte mit der Solexa/Illumina Technology [116]. Zur Erstellung der Sequenzierbanken wurde das NEBNext ultra DNA kit (NEB, Ipswich, MA, USA) verwendet. Die Sequenzierung wurde mit dem Illumina GAii sequencer (Illumina, San Diego, USA) durchgeführt.

In beiden Fällen wurden die Einzelschritte der Sequenzierung vom technischen Personal des G2L durchgeführt.

2.5 Arbeiten mit Phagen

2.5.1 Isolation von Phagenpartikeln

Übernachtskulturen von *B. licheniformis* in LB-Medium wurden genutzt um 4 ml LB im Reagenzglas auf eine OD₆₀₀ von 0,05 einzustellen. Diese Kulturen wurden unter starkem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach 2 h wurde Mitomycin C mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt und damit die Prophagen induziert. Eine nicht induzierte Kultur wurde als Kontrolle geführt. Das Wachstum der Kultur wurde mittels Dichtemessungen verfolgt unter Benutzung des Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter mit einem Grünfilter (KLETT Mfg. Co. Inc., NY, USA). Acht Stunden nach der Induktion wurde der Überstand von den Zellen mittels Zentrifugation bei 2500 g für 5 min getrennt und mit einem Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) sterilfiltriert. Zur Beseitigung von freier Nukleinsäuren und potentiell übrig gebliebener *Bacillus*-Zellen wurde dem sterilfiltrierten Überstand RNase A (Qiagen, Hilden, Deutschland), DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und Lysozym (SERVA Heidelberg, Deutschland) mit einer Endkonzentration von je 10 µg/ml versetzt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Phagenpartikel mittels der Sorval Ultrazentrifuge OTD50B (DuPont, Newtown, USA) mit dem 60Ti Rotor bei 200000 g für 4 h sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Phagenpellet in 200 µl TMK-Puffer [49] gelöst.

TMK-Puffer

10 mM	Tris pH 7,5
5 mM	MgCl ₂
300 mM	KCl
ad. 1 L	H ₂ O

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die für die Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Kulturen wurden aerob in einem 100 ml Schikanekolben mit 10 ml Kulturvolumen angezogen. Die Kolben waren vollständig mit Alufolie eingekleidet, um das GFP vor schädlicher Lichteinwirkung zu schützen. Um die Zellen während des Mikroskopievorganges unbeweglich zu machen, wurden die Objektträger mit 0,7%iger, in Wasser aufgekochter Agarose beschichtet. Hierbei wurde diese mit 68 °C auf einen Objektträger gegeben und mit einem weiteren Objektträger abgedeckt. Nach dem Erkalten und kurz vor dem Mikroskopieren wurden die beiden Objektträger vorsichtig voneinander gelöst und mit dem Objektträger weitergearbeitet, auf dem die Agarose verblieb. Die Kulturen wurden direkt nach der Anzucht auf Eis gestellt und dort bis zum Mikroskopiervorgang gelagert. Zum Mikroskopieren wurden 5 µl der Kultur auf die Agarose pipettiert und vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt. Mikroskopiert wurde mit dem AXIO Imager M2 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland). Es wurde eine 40-fache bis 100-fache Vergrößerung und Belichtungszeiten von 0,5 bis 20 sec benutzt.

2.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Um Phagen morphologisch charakterisieren zu können müssen diese sichtbar gemacht werden. Hierfür eignet sich Transmissionselektronenmikroskopie, wobei in dieser Arbeit die Technik der Negativkontrastierung eingesetzt wurde.

Für die Negativkontrastierung wurde ein, mit einem Kohlenstofffilm beschichteter, Kupfergrid (Kohlefilm auf 3.05mm Kupfernetzchen 300mesch, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) benutzt. Der Kupfergrid wurde mit dem Kohlenstofffilm auf einen Tropfen Phagensuspension gelegt und etwa 3 min inkubiert. Damit wurden die Phagenpartikel vom Grid absorbiert. Anschließend wurde das Grid mit den absorbierten Phagen von der Phagensuspension abgenommen und die verbleibende Phagensuspension partiell auf dem Grid angetrocknet, um einen Konzentrationsgradienten auf dem Grid zu erzeugen. Daraufhin wurde der Grid mit der Probe auf einen H₂O-Tropfen gelegt und gleich wieder aufgenommen, um überschüssiges Material abzuwaschen. Das auf dem Grid verbliebenen H₂O wurde mit Filterpapier abgezogen und das Grid auf einen

Tropfen einer Uranylacetatlösung (4% w/v in H₂O) aufgelegt, abgenommen und die überschüssige Uranylacetatlösung mit Filterpapier abgezogen. Das Uranylacetat lagerte sich hierbei in die Proteinzwischenräume der Phagenpartikel und um diese herum an und ermöglichte damit das Sichtbarmachen der Phagenstruktur im Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Die Aufbewahrung des Grids bis zur Verwendung im TEM erfolgte in einer Petrischale bei Raumtemperatur.

Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde mit einem JEM 1011 Transmissionselektronenmikroskop (Jeol Ltd., Eching, Deutschland) vorgenommen. Die Bilder wurden mit der Orius SC 1000 A CCD Kamera aufgenommen und das digitale Bildmaterial mit der Software von Gatan (München, Deutschland) verarbeitet.

Die unmittelbaren Mikroskopierarbeiten wurden von PD Dr. Michael Hoppert durchgeführt.

2.7 Bioinformatische Methoden

2.7.1 TraV

Das Programm TraV [117] ist entwickelt worden um *next-generation sequencing* (NGS)-Transkriptomdaten zu visualisieren und analysieren. Es zeichnet sich aus durch strangspezifische Darstellung der Transkriptomdaten, eine einzelbasenbezogene Auflösung der Transkriptaktivität, das direkte Markieren von Sequenzabschnitten durch das Zuladen von gff-Dateien (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/gff/spec.html>), die integrierten Analysewerkzeuge und die Möglichkeit mehrere Datensätze parallel betrachten und analysieren zu können.

Dieses Programm wurde dafür benutzt, Analysen auf den *B. licheniformis* Transkriptomdatensätze [94] zu machen. Weiterhin wurde das Programm zum Ermitteln aktiver Prophagenbereiche in *B. licheniformis* DSM13 und seinen Derivaten verwendet.

2.7.1.1 Zuordnung von Nukleotidsequenzen in einem Genome

NGS-Phagensequenzdaten wurden mit dem Programm *bowtie2* [118], mit einer 98%igen Genauigkeit, auf das Genom von *B. licheniformis* DSM13 kartiert. Dieser Vorgang resultierte in einer SAM-Datei, die mit dem Programm *samtotds*

[117] in eine tds-Datei umgeschrieben und mit dem Programm TraV (siehe Kapitel 2.7.1) visualisiert wurde.

2.7.1.2 Normalisieren von Phagensequenzdaten

Um Phagensequenzdaten vergleichbar zu machen, wurde eine gff-Datei mit kontinuierlich aufeinander folgenden 1 kb Fragmenten erzeugt und unter Zuhilfenahme dieser gff-Datei und der in TraV geladenen Phagensequenzdaten (siehe Kapitel 2.7.1.2) normalisierte NPKM-Werte berechnet (siehe Kapitel 2.7.1.3). Die Ausgabe wurde anschließend grafisch aufbereitet.

2.7.1.3 Ermittlung der Transkriptionsabdeckung

Für die Ermittlung der Transkriptionsabdeckung wurde das Programm TraV (siehe Kapitel 2.7.1) benutzt. Hierfür wurde eine gff-Datei erstellt, in welcher die Koordinaten der 5'UTRs sowie der dahinter liegenden Gene definiert wurden. Spezifikationen für die Erstellung einer gff-Datei können auf der *Welcome Trust Sanger Institute* Internetseite eingesehen werden (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/gff/spec.html>). Mittels dieser gff-Datei wurde unter Benutzung der TraV internen Analysewerkzeuge NPKM-Werte berechnet (NPKM = *nucleotide activity per kilobase of exon model per million mapped reads* [94]), welche die transkriptionelle Aktivität des entsprechenden Bereiches wiedergeben. Diese Werte wurden anschließend mit einander ins Verhältnis gesetzt (NPKM 5'UTR / (NPKM mRNA / 100)).

2.7.2 Vorhersage von Transkriptionsterminatoren

Die Vorhersage der Transkriptionsterminatoren wurde mittels einer lokalen Installation des Programms TransTermHP 2.09 [119] durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in eine gff-Datei umgewandelt um sie in TraV einsetzen zu können. Die Vorhersage und Umwandlung in eine gff-Datei wurde von Sascha Dietrich durchgeführt.

2.7.3 Überprüfung der RNA-Elemente auf proteinkodierende Bereiche

Um sicherzustellen, dass die untersuchten RNA-Elemente keine proteinkodierenden Bereiche beinhalten, wurden die RNA-Sequenzen mittels des Programmes BLAST [120] gegen die Swissprot Datenbank (Release 2013_03)

[121] abgeglichen. Anschließend erfolgte ein Abgleich, in allen drei Leserahmen, mittels eines lokalen InterProScan (*release* 39.0) [122].

Die bioinformatische Umsetzung dieser Untersuchung wurde durch Sascha Dietrich vorgenommen.

2.7.4 Erstellung von Kovarianzmodellen

Der Vorteil eines Kovarianzmodells liegt darin, dass hier nicht nur die primäre Sequenzinformation sondern auch die sekundäre Strukturinformation eines RNA-Moleküls genutzt wird um mittels Abgleich eine ähnliche Sequenz/Struktur zu identifizieren. Der Nachteil besteht darin, dass man mehrere homologe Instanzen eines RNA-Elements braucht, um ein *Alignement* erstellen zu können welches potentielle Varianzen offen legt.

Zur Erstellung der Kovarianzmodelle wurden zuerst mittels eines lokalen BLASTN (BLAST 2.2.29+) homologe Sequenzen der gewünschten Instanzen in weiteren *B. licheniformis* Genomen (siehe Tabelle 6) identifiziert. Vorhandene homologe Bereiche wurden mittels des internen Skripts `write_orf_dna_seqs.pl` aus den entsprechenden Genomen gezogen und für ein *Alignement* mit Murlet [123] verwendet. Das erstellte *Alignement* wurde für die Generierung eines Kovarianzmodells mit dem Softwarepaket Infernal 1.1rc1 [124] benutzt.

Die erstellten Kovarianzmodelle wurden zuerst auf die zum Zeitpunkt der Arbeit verfügbaren *B. licheniformis*-Stämme und anschließend auf eine Auswahl weiterer *Bacillus*-Genome angewendet (Tabelle 6), um weitere Kandidaten und die Verteilung der potentiellen *cis*-regulatorischer Elemente zu bestimmen.

Tabelle 6: In der Untersuchung mittels Kovarianzmodellen verwendete Stämme

Stamm	Genom-Status	Referenz
<i>B. licheniformis</i> DSM13	öffentlich	[35, 36]
<i>B. licheniformis</i> BAE*	intern	[98–100]
<i>B. licheniformis</i> 10-1-A	öffentlich	[125]
<i>B. licheniformis</i> 5-2-D	öffentlich	[125]
<i>B. licheniformis</i> MB3	intern	Eigenisolat G2L
<i>B. licheniformis</i> DSM603	intern	DSMZ Braunschweig
<i>B. licheniformis</i> DSM8785	intern	DSMZ Braunschweig
<i>B. licheniformis</i> 9945A	öffentlich	[97]
<i>B. licheniformis</i> MB1	intern	Eigenisolat G2L

Stamm	Genom-Status	Referenz
<i>B. licheniformis</i> MB2	intern	Eigenisolat G2L
<i>B. licheniformis</i> MB4	intern	Eigenisolat G2L
<i>B. licheniformis</i> SP1	intern	[126]
<i>B. licheniformis</i> WX02	öffentlich	[127]
<i>B. licheniformis</i> DSM1969	intern	DSMZ Braunschweig
<i>B. licheniformis</i> DSM12369	intern	DSMZ Braunschweig
<i>B. licheniformis</i> DSM12370	intern	DSMZ Braunschweig
<i>B. licheniformis</i> DSM1813	intern	DSMZ Braunschweig
<i>B. subtilis</i> W23	öffentlich	[128]
<i>B. subtilis</i> 168	öffentlich	[129]
<i>B. atrophaeus</i> 1942	öffentlich	[130]
<i>B. pumilus</i> SAFR-032	öffentlich	[131]
<i>B. pumilus</i> S1	öffentlich	[132]
<i>B. pumilus</i> DSM27 (ATCC7061)	öffentlich	[133]
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	öffentlich	[134]
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	öffentlich	[135]
<i>B. cereus</i> ATCC14579	öffentlich	[136]
<i>B. anthracis</i> Ames	öffentlich	[137]
<i>B. thuringiensis</i> BMB171	öffentlich	[138]
<i>B. thuringiensis</i> ATCC10792	öffentlich	[139]
<i>B. pseudomycooides</i> DSM12442	öffentlich	[139]
<i>B. mycooides</i> DSM2048	öffentlich	[139]
<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4	öffentlich	NC_010184
<i>B. cytotoxicus</i> NVH 391-98	öffentlich	[140]
<i>B. megaterium</i> DSM319	öffentlich	[141]
<i>B. cellulosilyticus</i> DSM2522	öffentlich	NC_014829
<i>B. clausii</i> KSM-K16	öffentlich	[142]
<i>B. halodurans</i> C-125	öffentlich	[143]
<i>B. pseudofirmus</i> OF4	öffentlich	[144]
<i>B. selenitireducens</i> MLS10	öffentlich	NC_014219.1
<i>B. coagulans</i> 2-6	öffentlich	[145]

*Bei Stamm *B. licheniformis* BAE handelt es sich um *Bacillus aeolius* DSM 15084 [98, 99]. Da neuere Erkenntnisse darauf hinweisen, dass es sich um einen *B. licheniformis* [100] handelt, wurde dieser in dieser Arbeit als solcher geführt.

2.7.5 Darstellung der MLST-Phylogenie bei *B. licheniformis*-Stämmen

Zur Darstellung der Phylogenie wurde nach Madslien *et al.*, 2012 [146] verfahren. Hierfür wurden die Sequenzfragmente der Gene *adk*, *ccpA*, *recF*, *sucC*, *rpoB* und *spoOA* unter Benutzung der von Madslien angegebenen Oligonukleotidsequenzen

aus der Genomsequenz von *B. licheniformis* DSM13 genommen und mittels BLASTN (BLAST 2.2.29+) in weiteren *B. licheniformis* Stämmen (siehe Tabelle 6) identifiziert. Die mittels Kovarianzmodell ermittelten Instanzen (siehe Kapitel 3.4.2) wurden mit dem internen Skript `write_orf_dna_seqs.pl` aus den entsprechenden Genomen isoliert. Für jeden Stamm wurden die so gewonnenen Sequenzen in der oben genannten Reihenfolge aneinander gehängt und in einer Multi-FASTA-Datei vereinigt. Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Mega 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) [147]. Zuerst wurde ein *Alignment* mit CLUSTALW [148] erstellt und für die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums benutzt. Der Stammbaum wurde mit der *Neighbor-Joining* Methode erstellt [149]. Die Verteilung wurde einem *bootstrap test* [150] mit 500 Replikaten unterzogen. Bei der Erstellung des Stammbaums wurde die evolutionäre Distanz der Stämme zu einander berücksichtigt. Die evolutionäre Distanz wurde nach der *Maximum Composite Likelihood* Methode berechnet [151].

2.7.6 Identifizierung von Prophagenregionen

Für die bioinformatische Vorhersage von Prophagenregionen im Genome von *B. licheniformis* DSM13 wurde das webbasierte Programm *Prophage Finder* [56] mit den vorgeschlagenen Standardparametern (E-value 0.5, Hits per Prophage 5, Hit Spacing 5500) benutzt. Die Ausgabe dieser Vorhersage wurde manuell evaluiert und alle proteinkodierenden Gene in den potentiellen Prophagenbereichen mittels des webbasierten Systems InterProScan [152] neu annotiert.

Die Prophagenregionen wurden weiter eingegrenzt anhand der Schwankungen des GC-Gehalt. Variationen im GC-Gehalt wurden mit dem Programm Artemis [153] ermittelt. Prophagenregionen sind oft stammspezifisch [53]. Die Einzigartigkeit der Prophagenregionen wurde mit dem Skript *rod_finder* (<https://github.com/aleimba/bac-genomics-scripts>) ermittelt, wobei die Genome von *B. licheniformis* 9945A (CP005965) [97] und *B. subtilis* 168 (NC_000964) [154] als Vergleichsgenome benutzt wurden.

Um die Prophagenregionen genau einzugrenzen, wurden die Integrationssequenzen der Prophagen ermittelt. Diese bestehen aus identischen sich direkt wiederholenden Sequenzen. Für die Identifikation wurde an den

mittels GC-Gehalt und Genannotation ermittelten Grenzbereichen 500 bp-Sequenzabschnitte von beiden Seiten der Prophagen gegeneinander abgeglichen. Hierfür wurde das Programm CloneManager (Sci-Ed Software, Cary NC, USA) verwendet.

2.7.7 Phylogenetische Klassifizierung von Prophagenregionen

Die Klassifizierung der in dieser Arbeit identifizierten Prophagenregionen erfolgte mittels Abgleich mit bekannten Phagengenomen. Hierfür wurden 979 Bakteriophagengenome (siehe Tabelle 7) benutzt und am 5. Juni 2013 aus der öffentlichen NCBI-Datenbank heruntergeladen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes_viruses). Unter Zuhilfenahme des *cds_extractor* (v0.6) Skripts (<https://github.com/aleimba/bac-genomics-scripts>) wurde aus diesen Phagengenomen die Proteinsequenzen extrahiert und um die Prophagenproteine des *B. subtilis* 168 PBSX-Prophagen (NC_000964) ergänzt. Daraus wurde eine Protein-BLAST-Datenbank erstellt. Mittels BLASTP erfolgte ein Abgleich der *B. licheniformis* DSM13-Prophagenproteine gegen die erstellte Datenbank. Auf diese Art identifizierte Proteine der bekannten Phagen wurden mit ihren Gegenstücken, unter Benutzung des Needleman-Wunsch-Algorithmus [155] mittels EMBOSSneedle [156] mit Standardeinstellungen miteinander verglichen, wobei der Vergleich auf ganzer Proteinelänge erfolgte. Für die weitere Betrachtung wurden nur Treffer mit dem höchsten Punktwert verwendet. Treffer mit einem Punktwert kleiner 30 wurden nicht weiter betrachtet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 17 zu finden. Die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Volland durchgeführt.

Tabelle 7: Für die phylogenetische Klassifizierung benutzt Phagengenomen

Phagenfamilie	genetisches Material	Anzahl der Genome
<i>Microviridae</i>	<i>ssDNA Phagen</i>	16
<i>Inoviridae</i>		32
<i>Corticoviridae</i>		1
<i>Myoviridae</i>		226
<i>Plasmaviridae</i>		1
<i>Podoviridae</i>	<i>dsDNA Phagen</i>	158
<i>Siphoviridae</i>		425
<i>Tectiviridae</i>		4
<i>unclassified</i>		62
<i>Cytoviridae</i>	<i>dsRNA Phagen</i>	5
<i>Leviviridae</i>	<i>ssRNA Phagen</i>	11
unklassifizierte Phagen	unklassifizierte Phagen	38

3 Ergebnisse

3.1 Prophagen in *B. licheniformis* DSM13

Auf Grundlage von RNA-seq Datensätzen von ausgewählten Wachstumsphasen einer industrienahen Fermentation, erstellt in unserer Arbeitsgruppe, sowie aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen, wurde eine Reannotation des *B. licheniformis* DSM13 Originalgenoms von 2004 (AE017333, Veith *et al.*, 2004) durchgeführt und publiziert [94]. Dabei lag ein Schwerpunkt auf der Annotation der Prophagen (siehe Kapitel 3.1.1).

3.1.1 Prophagen im Genom von *B. licheniformis* DSM13

Zur Identifizierung von Prophagen in *B. licheniformis* DSM13 wurde dessen Genom bioinformatisch mit dem Programm *Prophage Finder* auf das Vorhandensein von Prophagen überprüft (siehe Kapitel 2.7.6). Die vorhergesagten Kandidaten wurden weiter evaluiert basierend auf GC-Gehalt, Größe, Vorhandensein von Integrationssequenzen, Genausstattung und Einzigartigkeit in *B. licheniformis* DSM13. Dadurch konnten sieben Regionen BLi_Pp1-BLi_Pp7 als Prophagen annotiert werden (siehe Tabelle 8). In ihrer Gesamtheit machen die Prophagen von *B. licheniformis* DSM13 4,7% des Genoms aus.

Tabelle 8: Prophagenregionen von *B. licheniformis* DSM13

Prophage	GC-Gehalt	Größe in (bp)	Integrationssequenzen #	Lokalisation
BLi_Pp1	38,10	11177	61 - 6 bp	927299 - 938595
BLi_Pp2	47,05	27509*	keine	1317754 - 1345262
BLi_Pp3	42,50	41566	27 - 1 bp	1422556 - 1464174
BLi_Pp4	44,73	38319	256 - 13 bp	1504028 - 1542847
BLi_Pp5	39,89	10524	50 - 3 bp	2855587 - 2866209
BLi_Pp6	40,95	44793	18 bp	3424376 - 3469186
BLi_Pp7	35,58	21733	19 - 1 bp	4155490 - 4177258

In der Tabelle sind verschiedene Parameter zu den annotierten Prophagen BLi_Pp1 –Bli_Pp7 angegeben. Der GC-Gehalt des Wirts beträgt 46,2%. Die Prophagengröße bezieht sich auf die Sequenz zwischen den Integrationssequenzen. *Für BLi_Pp2 wurde die Größe anhand der Annotation ermittelt. # Die Länge der Integrationssequenzen und die Anzahl der Abweichungen sind in Basenpaaren (bp) angegeben. Alle Koordinaten beziehen sich auf die bei NCBI hinterlegte Genomsequenz mit dem *access code* NC_006322.1.

Bei den Prophagenregionen BLi_Pp1 und BLi_Pp3 – Bli_Pp7 konnten Integrationssequenzen identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um identische sich direkt wiederholende Sequenzen, die bei der Integration entstehen. Ein Vergleich der Genome von *B. licheniformis* DSM13 mit *B. licheniformis* 9945A und *B. subtilis* 168 offenbarte, dass sechs der sieben Prophagenregionen spezifisch für den Stamm *B. licheniformis* DSM13 sind. Prophagenregion BLi_Pp2 weist Orthologe in den beiden Bezugstämmen auf. Dabei handelt es sich um einen PBSX-orthologer Prophage, der in *B. licheniformis* DSM13 bereits experimentell nachgewiesen wurde [51, 52, 66]. Für BLi_Pp2 konnten keine Integrationssequenzen nachgewiesen werden.

3.1.2 Klassifizierung der Prophagen

Um die in *B. licheniformis* DSM13 identifizierten Prophagen zu klassifizieren wurden deren Proteine gegen die Proteine von 979 in der öffentlichen NCBI-Datenbank vorliegende Phagen Genome abgeglichen (siehe Kapitel 2.7.7).

Proteingene, kodiert vom BLi_Pp2-Prophagen, waren zu 89% zu den Phagenproteinen, kodiert durch den *B. subtilis* 168 Prophagen PBSX, homolog. Nur vier Proteine des BLi_Pp2-Prophagen zeigten eine höhere Ähnlichkeit zu

Proteinen anderer Phagen als zu den Proteinen des PBSX-Prophagen. Proteine der anderen *B. licheniformis* DSM13 Prophagenbereiche zeigten ausschließlich Ähnlichkeit zu Phagen der Ordnung *Caudovirales*. Der überwiegende Teil entfiel auf die Virusfamilie *Siphoviridae*. Die detaillierten Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 17 im Anhang zu finden.

3.1.3 Erstellung von *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3

Für nachfolgende Aktivitätsuntersuchungen (siehe Kapitel 3.1.4-3.1.7) war es nötig, den BLi_Pp3-Prophagen zu deletieren. Die Deletion dieses Prophagen erfolgte im Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX, einem BLi_Pp2-defizienten *B. licheniformis* MW3, einem Restriktions-Modifikationssystem defizienten Derivat des *B. licheniformis* DSM13 (siehe Tabelle 1).

Für die Erzeugung dieser Deletionsmutante wurde der Deletionsvektor pKVM2- Δ BLi_Pp3 erstellt und für die Erstellung des Stammes *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 verwendet. Für die Erstellung des Deletionsvektors wurden die Oligonukleotide HLRH87/88/89/90 verwendet und wie im Kapitel 2.4.2.6 beschrieben verfahren. Die Deletionskassette wurde unter Benutzung der Endonukleasen *Bam*HI / *Bgl*II in den Vektor pKVM2 kloniert. Die erstellte Mutante wurde mittels eines *Southern Blot* (siehe Kapitel 2.4.4) überprüft. Als Sondenmatritze wurde das PCR-Produkt der Deletionskassette (HLRH87/90) verwendet. Aus sechs potentiellen Deletionsmutanten wurde chromosomale DNA präpariert (siehe Kapitel 2.4.1.2) und einem Verdau mit der Endonuklease *Sac*I (siehe Kapitel 2.4.1.9) unterzogen. Im Fall des Wildtypstammes wurde im *Southern Blot* eine 42 kb-Bande detektiert und im Fall des gewünschten Genotyps eine 2 kb-Bande. Wie in Abbildung 4 dargestellt wies Klon 6 im *Southern Blot* ein Signal des gewünschten Genotyps auf und wurde somit als *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 in die Stammhaltung aufgenommen. Um sicherzustellen das in Deletionsbereich keine Mutationsereignisse stattgefunden haben, wurde die betreffende Region mit den Oligonukleotiden HLRH105/106 amplifiziert und unter Verwendung der Oligonukleotide HLRH101/102/105/106 sequenziert. Dabei sind keine Abweichungen von der erwarteten Sequenz festgestellt worden.

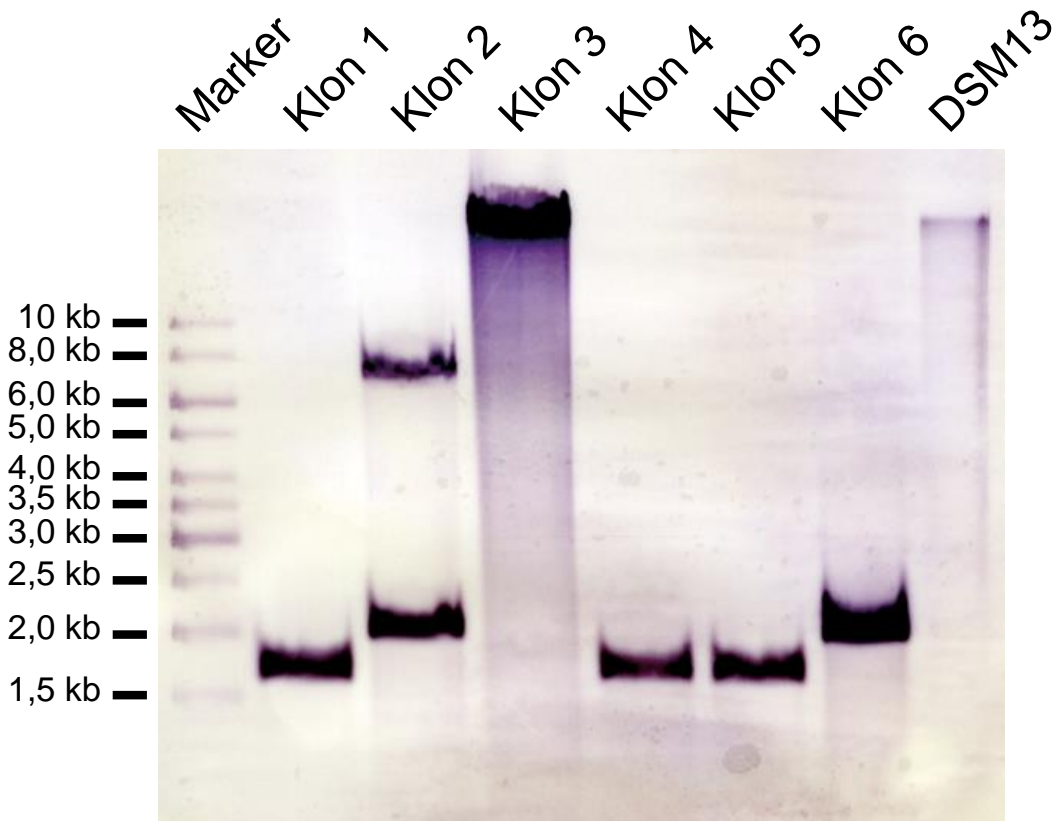


Abbildung 4: Southern Blot potentieller *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3-Stämme

Als Marker wurde GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde chromosomale DNA von *B. licheniformis* DSM13 verwendet. Im Fall der zu untersuchenden Klone wurden 3 μ g chromosomaler DNA, mit *Sac*I verdaut und aufgetragen. Im Fall der Positivkontrolle (chromosomale DNA von *B. licheniformis* DSM13) wurde 1 μ g chromosomaler DNA, mit *Sac*I verdaut und aufgetragen. Klon 6 wies ein Signal auf der Höhe des erwarteten Genotyps auf.

3.1.4 Prophageninduktion mit Mitomycin C

Um zu überprüfen, ob die im Kapitel 3.1.1 identifizierten Prophagen auch Phagenpartikel generieren können, wurden Prophageninduktionen mit Mitomycin C durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.1). Hierfür wurden die Stämme *B. licheniformis* DSM13, *B. licheniformis* MW3, die Prophagen-Einzelmutante *B. licheniformis* Δ PBSX und die Prophagen-Doppelmutante *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 verwendet. In Abbildung 5 ist zu sehen, dass die Kultur von *B. licheniformis* MW3 sich wie die Kultur von *B. licheniformis* DSM13 verhielt. Die Kulturen beider Stämme wurden nach 2 h mit 0,5 μ g/ml Mitomycin C induziert und beide induzierten Kulturen zeigten nach 3 h eine Trübungsabnahme und somit einen Lysiseffekt.

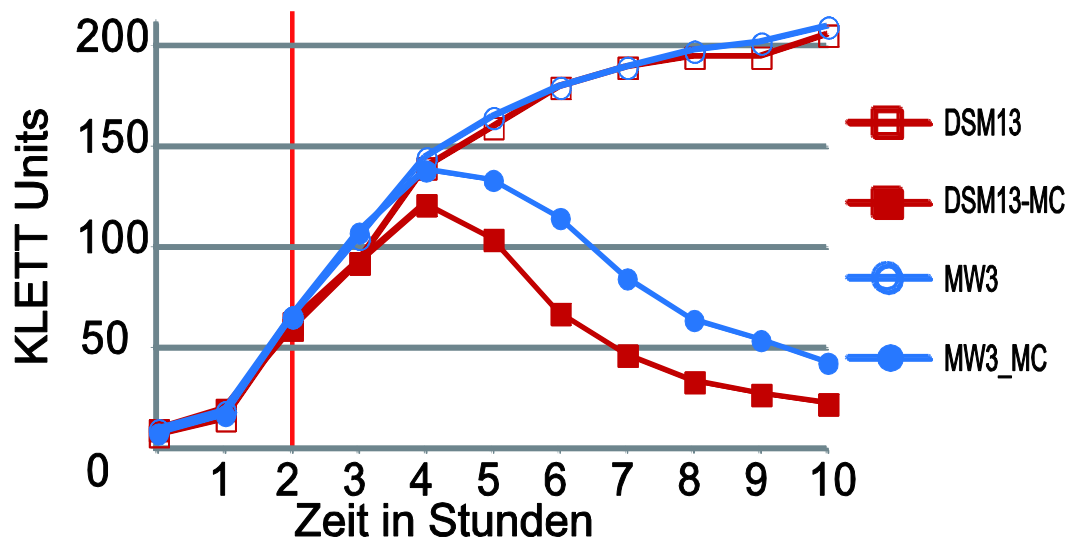


Abbildung 5: Wachstum von *B. licheniformis* DSM13 und MW3 mit und ohne Mitomycin C
 Der Induktionszeitpunkt mit 0,5 µg/ml Mitomycin C ist mit einer roten Linie bei 2 h markiert. Mit Mitomycin C induzierte Kulturen sind in der Legende mit MC gekennzeichnet. Beide Stämme induziert mit Mitomycin C weisen nach 3 h eine Trübungsabnahme und somit einen Lysiseffekt auf. Die nicht induzierten Kulturen weisen ein kontinuierliches Wachstum auf.

Die beiden Prophagenmutanten *B. licheniformis* Δ PBSX und Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 weisen eine Abweichung vom Verhalten des Wildtyps *B. licheniformis* DSM13 auf. Wie in Abbildung 6 zu sehen, war die erste Trübungsabnahme und somit der erste Lysiseffekt bei *B. licheniformis* Δ PBSX 6 h nach der Induktion mit Mitomycin C zu erkennen. Bei der Doppelmutante *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 war die Trübungsabnahme in der Dauer des Experiments vollständig ausgeblieben. Hier war in Bezug auf die nicht induzierte Kultur des gleichen Stammes nur eine Abschwächung des Wachstums zu sehen.

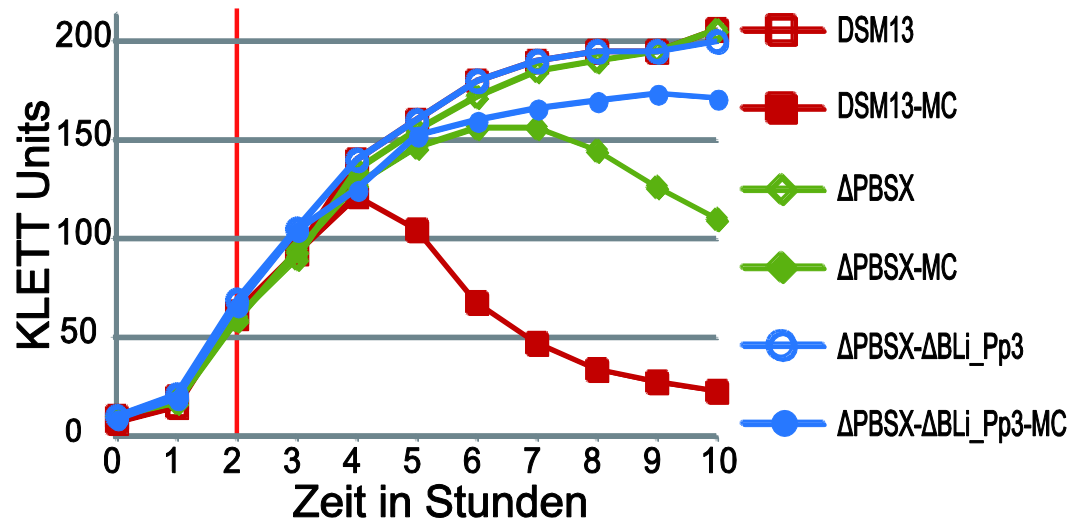


Abbildung 6: Wachstum von *B. licheniformis* DSM13, Δ PBSX und Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 mit und ohne Mitomycin C

Der Induktionszeitpunkt mit 0,5 μ g/ml Mitomycin C ist mit einer roten Linie bei 2 h markiert. Mit Mitomycin C induzierte Kulturen sind in der Legende mit MC gekennzeichnet. Die induzierte Kultur von *B. licheniformis* DSM13 weist nach 3 h eine Trübungsabnahme und somit einen Lysiseffekt auf. Die induzierte Kultur von *B. licheniformis* weist nach 6 h eine Trübungsabnahme und somit einen Lysiseffekt auf. Die induzierte Kultur von *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 weist keine Trübungsabnahme auf. Alle nicht induzierten Kulturen weisen ein kontinuierliches Wachstum auf.

Nach Abschluss der Phageninduktion wurden aus den Kulturen die Phagenpartikel, wie im Kapitel 2.5.1 beschrieben, aufgereinigt und für weitere Untersuchungen verwendet.

3.1.5 Transmissionselektronenmikroskopie von Phagenpartikeln

Die Phagensuspension, gewonnen durch Induktion der Stämme *B. licheniformis* DSM13, MW3, Δ PBSX und Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 mit Mitomycin C (Kapitel 2.5.1 und 3.1.4), wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (siehe Kapitel 2.6.2) untersucht. Dabei wurde in den Phagensuspensionen, gewonnen aus *B. licheniformis* DSM13 und MW3, in sehr großer Menge nur ein Phagenpartikeltyp beobachtet. Dieser entsprach der Morphologie des PBSX-Prophagen [52] aus *B. subtilis* 168 (siehe Abbildung 7 A). In der Phagensuspension gewonnen aus *B. licheniformis* Δ PBSX waren keine PBSX-ähnlichen Phagenpartikel zu finden. Da dieser Stamm sich vom Stamm *B. licheniformis* MW3 nur durch die Abwesenheit des BLi_Pp2 Prophagen unterschied, konnte daraus abgeleitet werden, dass die PBSX-ähnlichen

Phagenpartikeln ihren Ursprung im BLi_Pp2 Prophagen hatten. Abgesehen von der Abwesenheit des PBSX-ähnlichen Phagenpartikels konnte in der Phagensuspension des *B. licheniformis* Δ PBSX ein *Siphoviridae*-ähnlicher Phagenpartikel beobachtet werden (siehe Abbildung 7 B). In der Phagensuspension gewonnen aus *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 konnten keine Phagenpartikel aufgefunden werden. Da dieser Stamm sich vom Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX nur durch die Abwesenheit des BLi_Pp3 Prophagen unterscheidet, konnte daraus abgeleitet werden, dass die *Siphoviridae*-ähnlichen Phagenpartikel, beobachtet in den Phagensuspensionen aus *B. licheniformis* Δ PBSX, ihren Ursprung im BLi_Pp3 Prophagen hatten.

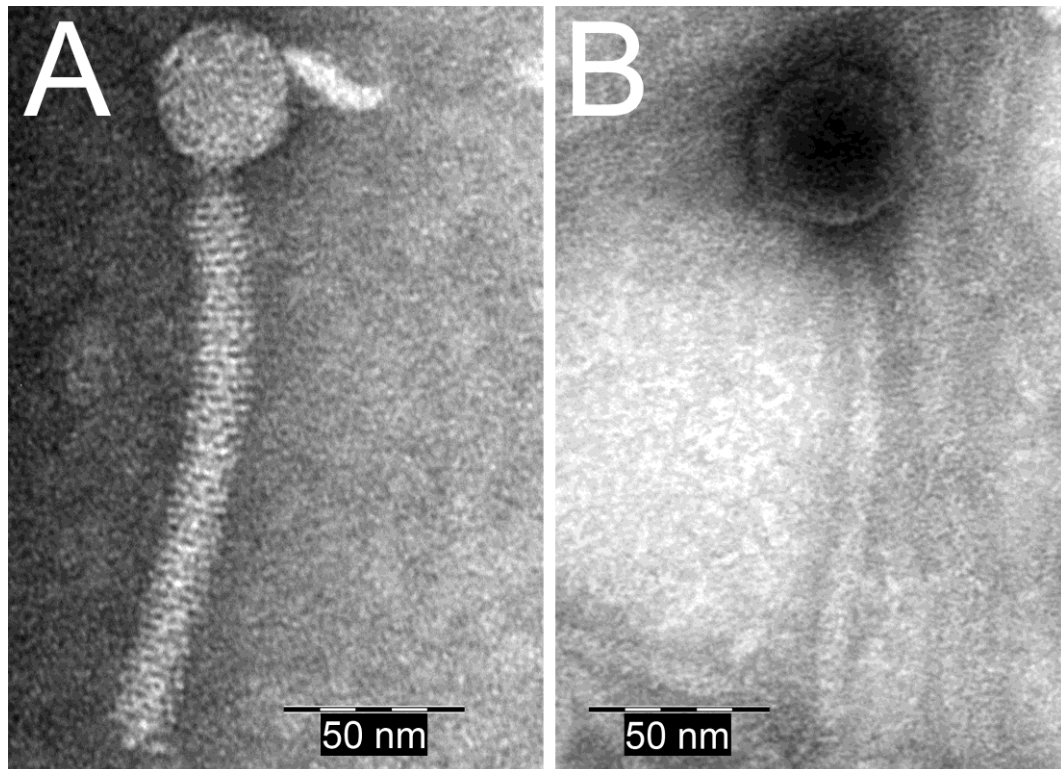


Abbildung 7: TEM-Bilder von Phagenpartikeln präpariert aus *B. licheniformis* DSM13 und seinen Derivaten.

A: PBSX-ähnlicher Phagenpartikel beobachtet in der Phagensuspension gewonnen aus einer *B. licheniformis* DSM13 Kultur. **B:** *Siphoviridae*-ähnlicher Phagenpartikel, beobachtet in der Phagensuspension gewonnen aus einer *B. licheniformis* Δ PBSX Kultur.

3.1.6 Gelelektrophorese der gewonnenen Phagen-DNA

Aus der Phagensuspension, gewonnen durch Induktion der Stämme *B. licheniformis* DSM13, MW3, Δ PBSX und Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 mit Mitomycin C (siehe Kapitel 2.5.1 und 3.1.4), wurde Phagen-DNA präpariert (siehe Kapitel 2.4.1.3) und in einem Agarosegel analysiert.

Im Agarosegel zeigten sich sowohl bei der *B. licheniformis* DSM13 als auch MW3 Phagen-DNA zwei Banden der Größe ~13 kb und ~40 kb (siehe Abbildung 8). Der Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX weist nur eine DNA-Bande auf mit einer Größe von ~40 kb. Da in Bezug auf die beiden Stämme *B. licheniformis* DSM13 und MW3, die ~13 kb Bande in der Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX nicht mehr auftrat, wurde daraus abgeleitet, dass diese mit dem abwesenden BLi_Pp2 Prophagen assoziiert ist.

Die Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 wies im Agarosegel keine DNA-Bande auf. Da in Bezug auf den Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX, die ~40 kb Bande in der Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 nicht mehr auftrat, wurde daraus abgeleitet, dass diese mit dem abwesenden BLi_Pp3 Prophagen assoziiert ist.

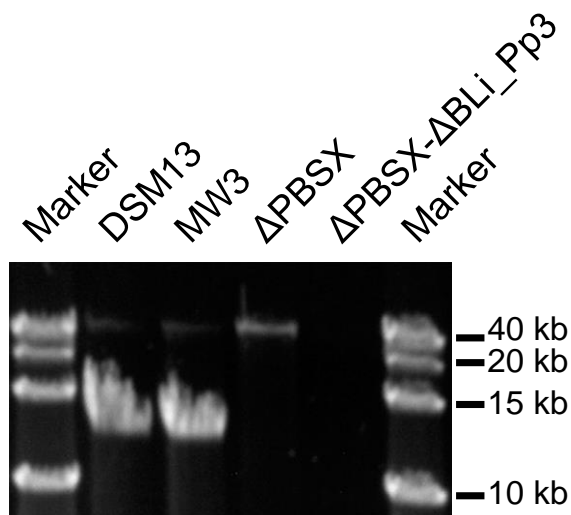


Abbildung 8: Gelelektrophorese von Phagen-DNA isoliert aus *B. licheniformis* DSM13 und seinen Derivaten.

Als Marker wurde der 1 kb Plus DNA Ladders (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) benutzt. Aufgetragen wurde ~200 ng DNA für Proben aus *B. licheniformis* DSM13, MW3 und Δ PBSX. Bei Proben aus *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 wurde das maximale Volumen der DNA-Lösung aufgetragen. Die Phagen-DNA-Präparation aus *B. licheniformis* DSM13 und MW3 weisen eine starke ~13 kb Bande und eine dünne ~40 kb Bande auf. Die Phagen-DNA-Präparation aus *B. licheniformis* Δ PBSX weist nur eine ~40 kb Bande auf. Die Phagen-DNA-Präparation aus *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 weist keine DNA auf.

3.1.7 Genetischer Ursprung der isolierten Prophagen-DNA

Um den genetischen Ursprung der beobachteten Phagen-DNA (siehe Kapitel 3.1.6) zu identifizieren, wurde diese sequenziert und untersucht.

3.1.7.1 Phagen-DNA aus *B. licheniformis* DSM13 und MW3

Mit der Untersuchung der phagenpartikelgeschützten DNA (siehe Kapitel 3.1.6) ist festgestellt worden, dass die Prophagenpartikel von *B. licheniformis* DSM13 zwei unterschiedliche DNA-Fragmente freisetzen. Um den Ursprung dieser DNA im Genom von *B. licheniformis* DSM13 zu identifizieren, wurde die phagenpartikelgeschützte DNA mittels NGS-Technologie (siehe Kapitel 2.4.6) sequenziert. Die generierten Sequenzen wurden im Genom von *B. licheniformis* DSM13 kartiert (siehe Kapitel 2.7.1.1) und diese Zuordnung mit dem Programm TraV (siehe Kapitel 2.7.1) visualisiert. Anschließend wurden mit TraV NPKM-Werte für kontinuierliche 1 kb-Fragmente berechnet (siehe Kapitel 2.7.1.3) und grafisch dargestellt (Abbildung 9).

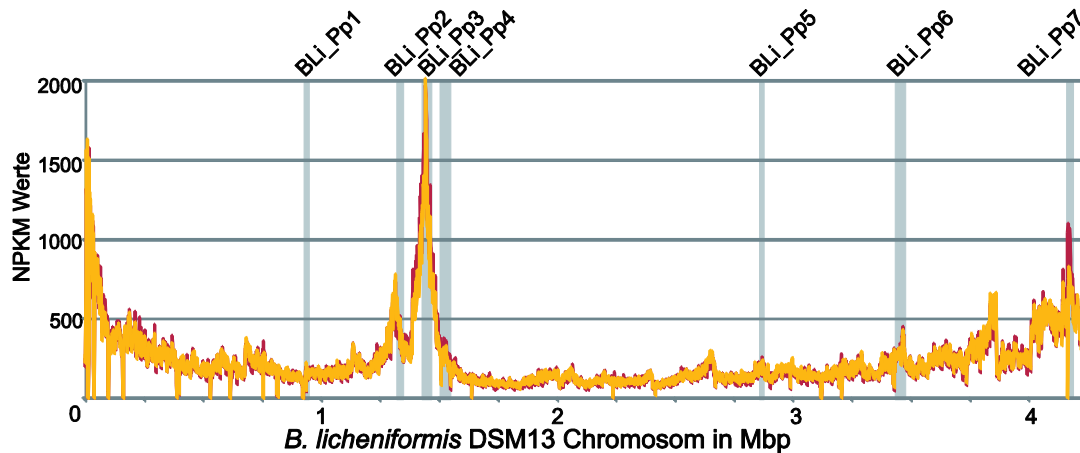


Abbildung 9: Sequenzverteilung der Phagen-DNA aus *B. licheniformis* DSM13 und MW3

Aufgetragen sind NPKM-Werte generiert mit TraV in kontinuierlichen 1 kb-Fragmenten aus den Sequenzzuordnungen der Phage-DNA, gewonnen aus *B. licheniformis* DSM13 (roter Graph) und MW3 (gelber Graph). Die Prophagenbereiche BLi_Pp1 bis BLi_Pp7 sind mit grauen Balken kenntlich gemacht. Die Sequenzverteilung beider Experimente ist vergleichbar. Im Bereich des chromosomalen Replikationsursprungs um 0 Mbp und 4 Mbp, ist eine Anhäufung der Sequenzen zu erkennen. Prophage BLi_Pp3 weist die höchste Sequenzanhäufung auf. Geringfügige Anhäufungen sind auch in den Prophagenbereichen BLi_Pp2, BLi_Pp6 und BLi_Pp7 zu beobachten.

In Abbildung 9 ist die Sequenzaufbereitung der Phagen-DNA für *B. licheniformis* DSM13 und MW3 zu sehen. Die Sequenzen der Phagen-DNA verteilen sich wannenförmig, fast gleichmäßig, auf dem Genom von *B. licheniformis* DSM13. Das trifft sowohl für die Sequenzen der Phagen-DNA aus *B. licheniformis* DSM13 als auch auf MW3 zu. Um den Prophagenbereich BLi_Pp3 gibt es die stärkste Anhäufung von Sequenzen. Diese weist keine klare Abgrenzung auf, sondern läuft zu beiden Seiten aus. Weiterhin konnten leichte Sequenzanhäufungen an den Prophagenregionen BLi_Pp2, BLi_P6 und BLi_Pp7 beobachtet werden. In der Prophagenregion BLi_Pp7 gibt es bei der Sequenzzuordnung der *B. licheniformis* MW3 Phagen-DNA im Vergleich zu der Sequenzzuordnung der *B. licheniformis* DSM13 Phagen-DNA einen Einbruch. Dieser ist auf die Deletion des RM-Systems in MW3 in dieser Region zurückzuführen. Alle weiteren Einbrüche in der Sequenzabdeckung sind bedingt durch das Zuordnungsverfahren. Bei diesem werden Sequenzen, die im Genom doppelt zugeordnet werden können, nicht berücksichtigt. Somit bleiben repetitive Sequenzbereiche frei von Sequenzabdeckung und führen zu den beobachteten Einbrüchen im Graph.

3.1.7.2 Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX

Die im Kapitel 3.1.7.1 betrachteten Stämme *B. licheniformis* DSM13 und MW3 besitzen beide einen PBSX-ähnlichen Prophagen [51, 52], der im Genom als BLi_Pp2 annotiert (siehe Kapitel 3.1.1) und experimentell, mittels TEM (siehe Abbildung 7 A), untersucht wurde. Die Abhängigkeit der ~13 kb Bande von dem PBSX-ähnlichen Prophagen BLi_Pp2 ist im Kapitel 3.1.6 experimentell nachgewiesen. Nun sollte überprüft werden, ob die ~13 kb Phagen-DNA-Bande (siehe Abbildung 8) wie beim PBSX-Prophagen aus *B. subtilis* 168 [157] hauptsächlich aus chromosomaler DNA besteht und zu der gleichmäßigen Sequenzverteilung der Phagen-DNA auf dem Genom von *B. licheniformis* DSM13 (siehe Kapitel 3.1.7.1) führte. Hierfür wurde Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX (Δ BLi_Pp2) gewonnen (siehe Kapitel 3.1.6), NGS sequenziert (siehe Kapitel 2.4.6) und ausgewertet (siehe Kapitel 3.1.7.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt.

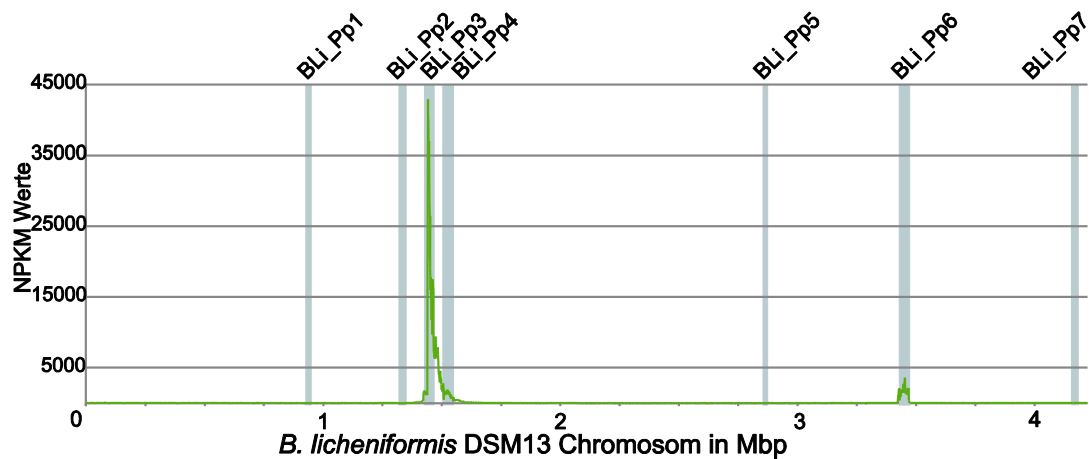


Abbildung 10: Sequenzverteilung der Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX

Aufgetragen sind NPKM-Werte, generiert mit TraV, in kontinuierlichen 1 kb-Fragmenten auf der Sequenzordnung der Phagen-DNA, gewonnen aus *B. licheniformis* Δ PBSX. Die Prophagenbereiche BLi_Pp1 bis BLi_Pp7 sind mit grauen Balken kenntlich gemacht. Prophage BLi_Pp3 weist die höchste Sequenzanhäufung auf. Diese ist nach links scharf abgegrenzt und klingt nach rechts, kontinuierlich über einen ~200 kb Bereich, aus. Eine geringere, nach beiden Seiten scharf abgegrenzte Sequenzanhäufung ist im Prophagenbereich BLi_Pp6 zu beobachten.

Es ist deutlich zu erkennen, dass es im Fall der Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX keine gleichmäßige Verteilung der Sequenzen auf dem Chromosom von *B. licheniformis* DSM13 vorliegt. Die einzigen beiden beobachteten Sequenzakkumulationen sind über zwei Prophagenbereichen lokalisiert. Daraus wurde abgeleitet, dass die in diesem Stamm abwesende ~13 kb Phagen- DNA-Bande, wie bei *B. subtilis* 168 vom PBSX Prophagen eingepackte chromosomale DNA darstellt. Diese vom Prophagen BLi_Pp2 transportierte Phagen-DNA war somit der Grund für die gleichmäßige Sequenzverteilung im vorangehenden Experiment, beschrieben im Kapitel 3.1.7.1.

Die stärkste Sequenzakkumulation war über dem Prophagen BLi_Pp3 zu beobachten. Diese Anhäufung ist nach links deutlich abgegrenzt und läuft nach rechts über eine Länge von 200 kb aus. Dieses Auslaufen der Sequenzakkumulation am Prophagen BLi_Pp3 deckt den benachbarten Prophagen BLi_Pp4 zusätzlich ab. Die zweite Sequenzakkumulation war über dem Prophagen BLi_Pp6 zu beobachten und war nur auf diesen konzentriert.

3.1.7.3 Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3

Bei der Untersuchung der Phagenpartikel, gewonnen aus dem Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX, war nur ein Typ von *Siphoviridae*-ähnlichen Phagenpartikeln beobachtet worden (siehe Abbildung 7 B). Auch die Betrachtung der Phagen-DNA im Agarosegel wies nur eine ~40 kb große DNA-Bande auf (siehe Abbildung 8). Die im Kapitel 3.1.7.2 beschriebene Untersuchung der NGS-sequenzierten Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX zeigte aber zwei Akkumulationen über zwei unterschiedlichen Prophagenbereichen, BLi_Pp3 und BLi_Pp6. Um zu klären, ob die ~40 kb Phagen-DNA-Bande mit der starken Prophagensequenzakkumulation am Prophagen BLi_Pp3 zusammenhängt, wurde Prophage BLi_Pp3 aus dem Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX deletiert (siehe Kapitel 3.1.3) und somit der Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 erstellt.

Der Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 reagierte bei Behandlung mit Mitomycin C nicht mit Lyse, wie die ihm zugrundeliegenden Stämme DSM13 und MW3 (siehe Abbildung 6). Im Phagenpräparat von *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 konnten mittels TEM (siehe Kapitel 2.6.2) keine Phagenpartikel identifiziert werden. Phagen-DNA aus der genannten Phagenpräparation konnte weder im Agarosegel visualisiert (siehe Abbildung 8) noch deren Konzentration mittels NanoDrop bestimmt werden (siehe Kapitel 2.4.1.6). Daraus ließ sich ableiten, dass der *Siphoviridae*-ähnlicher Phagenpartikel (siehe Abbildung 7 B) und die ~40 kb Phagen-DNA-Bande (siehe Abbildung 8) mit dem BLi_Pp3 Prophagen assoziiert sind.

Ungeachtet der nicht sichtbaren und nicht messbaren Phagen-DNA wurde diese mittels NGS sequenziert und wie im Kapitel 3.1.7.1 beschrieben untersucht. Die Phagen-DNA-Sequenzen akkumulierten ausschließlich im Bereich des Prophagen BLi_Pp6 (siehe Abbildung 11). Damit konnte neben dem PBSX-ähnlichem BLi_Pp2-Prophagen und dem *Siphoviridae*-ähnlicher BLi_Pp3-Prophagen, ein dritter phagenpartikelbildender Prophage im *B. licheniformis* DSM13 nachgewiesen werden.

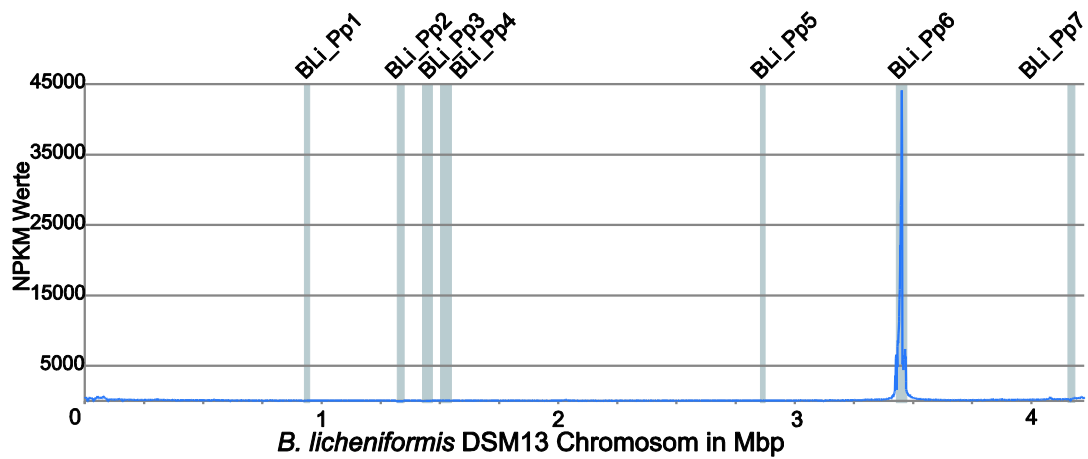


Abbildung 11: Sequenzverteilung der Phagen-DNA aus *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3

Aufgetragen sind NPKM-Werte, generiert mit TraV in kontinuierlichen 1 kb-Fragmenten auf der Sequenzzuordnung der Phagen-DNA, gewonnen aus *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3. Die Prophagenbereiche BLi_Pp1 bis BLi_Pp7 sind mit grauen Balken kenntlich gemacht. Prophage BLi_Pp6 weist die höchste Sequenzanhäufung auf. Diese ist nach links und rechts relativ scharf abgegrenzt

3.2 *E. coli* / *Bacillus Shuttle*-Vektoren und Reporterplasmide

Aufgrund der schwierigen genetischen Zugänglichkeit von *B. licheniformis* DSM13 ist der Großteil der für *Bacillus* entwickelten gentechnischen Methoden nur unter großem Aufwand verwendbar [60]. Aus diesem Grund sollen im Rahmen dieser Arbeit konjugative *Shuttle*-Vektoren und Reporterplasmide entwickelt werden, die sich unkompliziert für die Untersuchungen von regulatorischen Elementen in *B. licheniformis* einsetzen lassen.

3.2.1 *E. coli* / *Bacillus Shuttle*-Vektoren pV1 und pV2

Shuttle-Vektoren besitzen die Fähigkeit in mehr als einem Host zu replizieren und können auf Grundlage dieser Eigenschaft dafür benutzt werden, genetische Elemente von einem Wirt in einen anderen zu übertragen. Zur Übertragung von genetischen Elementen aus *E. coli* nach *Bacillus* wurden, im Rahmen dieser Arbeit, die *shuttle*-Vektoren pV1 und pV2 hergestellt. Zur Generierung des pV1 *Shuttle*-Vektors wurde mit dem Oligonukleotidpaar HLRH1/2 aus pUB110 die Replikationseinheit und die Kanamycinresistenzkassette für *Bacillus* amplifiziert. Mit dem Oligonukleotidpaar HLRH3/24 wurde die Replikationseinheit und die Ampicillinresistenzkassette für *E. coli* aus dem Vektor pSG1151 amplifiziert. In beiden Fällen wurden mittels Oligonukleotidüberhängen die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Asc*I an die PCR-Fragmente angehängt. Durch den Verdau beider PCR Fragmente und anschließender Ligation und Klonierung in *E. coli*, wurde der *Shuttle*-Vektor pV1 generiert. Der Vektor konnte erfolgreich aus *E. coli* isoliert (siehe Kapitel 2.4.1.1) und mittels Sequenzierung (siehe Kapitel 2.4.6) verifiziert werden. Unter Ausnutzung der genetischen Kompetenz wurde dieser in *B. subtilis* 168 transformiert (siehe Kapitel 2.4.2.4) und konnte anschließend erfolgreich re-isoliert werden (siehe Kapitel 2.4.1.1).

Da *B. licheniformis* DSM13 nur eine geringe genetische Kompetenz aufweist [39], die nicht mit der von *B. subtilis* 168 vergleichbar ist [61], war es für eine leichte Handhabung in *B. licheniformis* DSM13 notwendig, den *Shuttle*-Vektor konjugativ-übertragbar zu machen. Hierfür wurde der oriT des RP4-Plasmids [67] in pV1 integriert. Der pV1-Vektor wurde mittels PCR und dem Oligonukleotidpaar HLRH5/6 im Bereich zwischen *Bacillus*-Replikationseinheit und der Kanamycinresistenzkassette durch Amplifikation geöffnet. Der oriT wurde seinerseits mit dem Oligonukleotidpaar HLRH7/8 aus dem Vektor pKVM1

amplifiziert. Beide PCR-Fragmente wurden mittels Oligonukleotidüberhängen mit den Restriktionsschnittstellen *MauBI* und *BclI* versehen. Durch den Verdau beider PCR Fragmente, und anschließender Ligation und Klonierung in *E. coli*, wurde der *Shuttle*-Vektor pV2 erstellt (siehe Abbildung 12). Dieser kann durch den integrierten *oriT* für die Konjugation mobilisiert werden. Unter Benutzung des konjugativen Donorstamms *E. coli* S17-1 [96], in dem die konjugative Maschinerie des RP4-Vektors chromosomal integriert vorliegt, konnte der pV2-Vektor in diverse *Bacillus*-Stämme konjugativ übertragen und re-isoliert werden. Die Kontrolle des re-isolierten Vektors erfolgte durch einen *NcoI*-Restriktionsverdau und anschließende Gelelektrophorese (siehe Abbildung 13). Abbildung 14 zeigt, die nach einer konjugativen Übertragung von pV2 erhaltenen *Bacillus*-Transkonjuganten auf selektiven Platten. Die konjugative Übertragbarkeit von pV2 in die Laborstämme *B. subtilis* 168 und *B. licheniformis* MW3, ist im Vergleich zu *B. licheniformis* DSM13 effizienter.

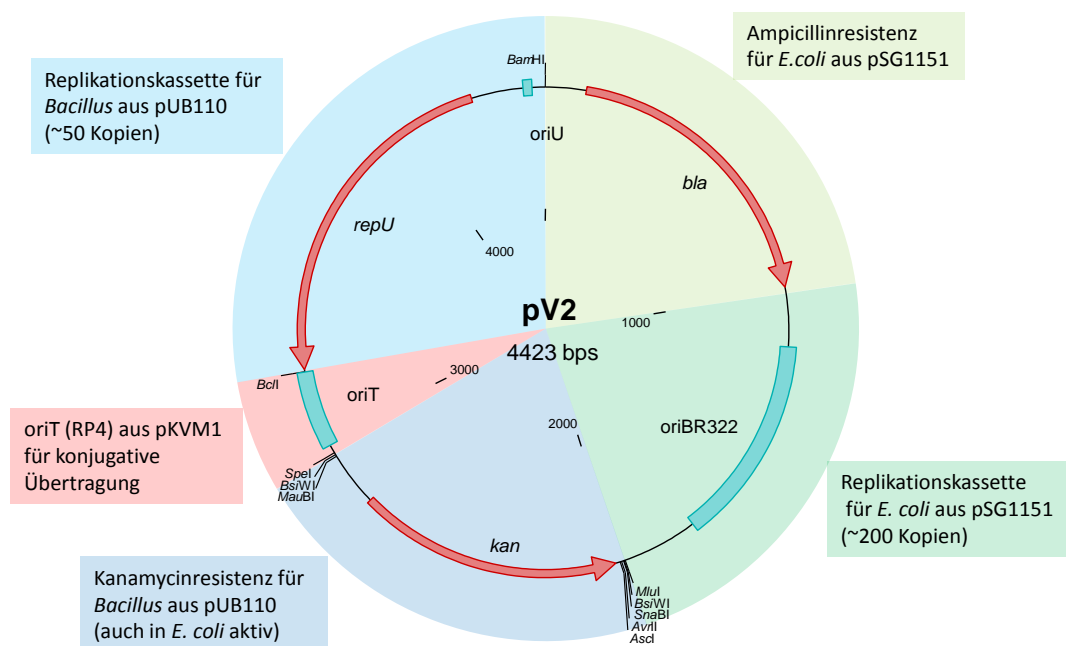


Abbildung 12: Vektorkarte des pV2 Vektors

Beim pV2-Vektor handelt es sich um einen konjugativ übertragbaren *E. coli* / *Bacillus*-Shuttle-Vektor. Dieser ist modular aufgebaut. Die einzelnen Elemente sind in der Darstellung mit unterschiedlichen Farben unterlegt. Beschreibungen der einzelnen Elemente sind in der Grafik abgebildet und mit der dazugehörigen Farbe markiert. Der Vektor pV1 unterscheidet sich von dem dargestellten pV2 nur durch die Abwesenheit des *oriT*.

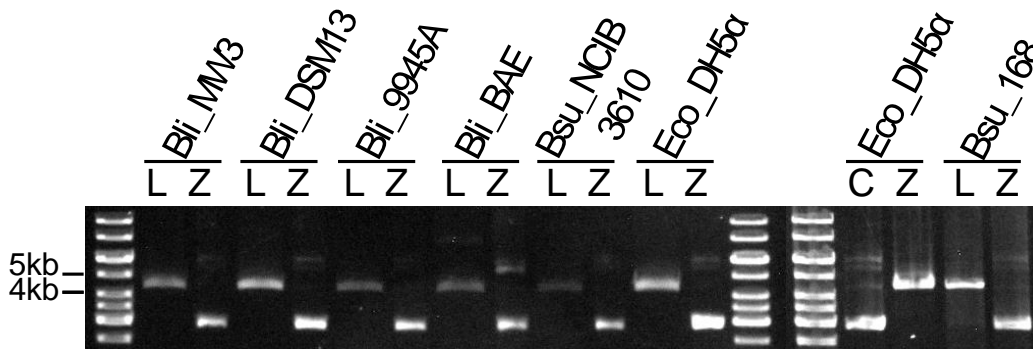


Abbildung 13: Restriktionskontrolle des re-isolierten pV2-Vektors

Gelelektrophoretische Auftrennung des pV2-Vektors. Dieser wurde aus verschiedenen *Bacillus*-Stämmen isoliert und sowohl zirkulär als auch mit der Endonuklease *NcoI* linealisiert aufgetragen. Der linealisierte Vektor entspricht 4,4 kb. Bli = *Bacillus licheniformis*, Bsu = *Bacillus subtilis*, Eco = *Escherichia coli*, L = linealisiert, Z = zirkulär.

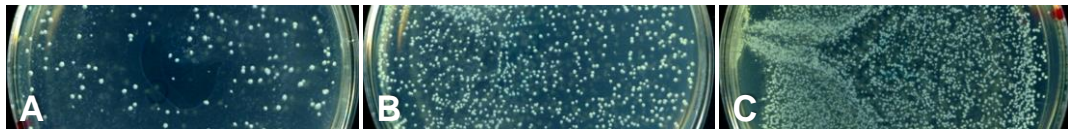


Abbildung 14: *Bacillus* Transkonjuganten nach Übertragung von pV2

Bacillus-Transkonjuganten mit dem konjugativ übertragenen pV2-Vektor auf selektiven NB-Agarplatten mit Kanamycin (25 µg/ml) und Polymyxin B (20 µg/ml). A: *B. licheniformis* DSM13. B: *B. licheniformis* MW3 (*B. licheniformis* DSM13-Derivat, defizient in zwei Restriktions-Modifikations-Systemen). C: *B. subtilis* 168, ein Modellorganismus für genetische Kompetenz mit guter genetischer Zugänglichkeit. Als Donorstamm diente *E. coli* S17-1.

3.2.2 pV3SDlacZ und pV3lacZ

Für die Untersuchung von Promotoraktivitäten in *B. licheniformis* wurden auf Grundlage des pV2-*Shuttle*-Vektors die Reportervektoren pV3SDlacZ und pV3lacZ hergestellt. Hierfür wurden die Reporter-kassetten aus pAC6 und pAC7 verwendet. pAC6 und pAC7 nutzen das *lacZ*-Gen der β -Galaktosidase aus *E. coli* als Reporter-gen zur Messung von Transkriptions- und Translationsaktivitäten. Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Vektoren liegt im 5' Bereich des *lacZ* Gens. Die Reporter-kassette des pAC6 hat eine Ribosomenbindestelle (RBS) vor dem *lacZ*. Der zu untersuchende Promotor kann in die vor dem *lacZ* liegende *Multi Cloning Site* (MCS) kloniert werden und benötigt keine native RBS. Hierbei wird die gemessene β -Galaktosidaseaktivität mit der Promotoraktivität korreliert. Auf diese Art kann auch die transkriptionelle Aktivität von Promotoren untersucht werden, die vor nicht proteinkodierenden Genen liegen, wie die von sRNAs. Die

Reporter-kassette des pAC7 besitzt keine RBS. Hier muss der Promotor von Interesse mit den ersten Triplets des dahinter liegenden Gens, also inklusive der nativen RBS, an das *lacZ* fusioniert werden. Mit so einem Konstrukt wird die native Genexpression eines proteinkodierenden Gens mittels β -Galaktosidaseaktivität ermittelt.

Diese beiden etablierten Systeme wurden für die Arbeit in *B. licheniformis* DSM13 nutzbar gemacht indem die Reporter-kassetten aus pAC6 bzw. pAC7 mit dem pV2 Vektor kombiniert wurden. Zunächst wurde mit den Oligonukleotidpaar HLRH120/121 die Reporter-kassette aus dem pAC6 amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.1.5), wobei mittels Oligonukleotidüberhängen an beiden Seiten die *AscI*-Erkennungssequenz angefügt wurde und zusätzlich vor das *lacZ*-Gen eine neue MCS angebracht wurde. Das PCR-Produkt wurde mit *AscI* und der pV2-Vektor mit *AscI* und *MluI* verdaut (siehe Kapitel 2.4.1.9). Durch Ligation des linealisierten Vektors mit dem PCR-Produkt und Klonierung in *E. coli* (siehe Kapitel 2.4.2.2) wurde der Vektor pV3SDlacZ hergestellt und mittels Sequenzierung (siehe Kapitel 2.4.6) verifiziert. Dieser trägt die Reporter-kassetten von pAC6 und kann zur Messung von Transkriptionsaktivitäten von Promotoren in *B. licheniformis* eingesetzt werden (siehe Abbildung 15). Zur Herstellung eines Reporter-vektors ohne artifizielle RBS, also ein Äquivalent zu pAC7, wurde im pV3SDlacZ und pAC7 die 5' Region der Reporter-kassetten mit den Endonukleasen *SmaI* und *SacI* ausgeschnitten (siehe Kapitel 2.4.1.9). Mittels Gelextraktion wurde das Vektorrückrad des pV3SDlacZ und das Fragment der Reporter-kassette aus pAC7 aufgereinigt (siehe Kapitel 2.4.1.8), miteinander legiert (siehe Kapitel 2.4.1.10) und kloniert (siehe Kapitel 2.4.2.2). Der hergestellte Vektor pV3lacZ wurde mittels Sequenzierung verifiziert (siehe Kapitel 2.4.6). Dieser trägt die *lacZ*-Reporter-kassette des pAC7 Vektors zur gekoppelten Messung von Transkriptions- und Translationsaktivitäten.

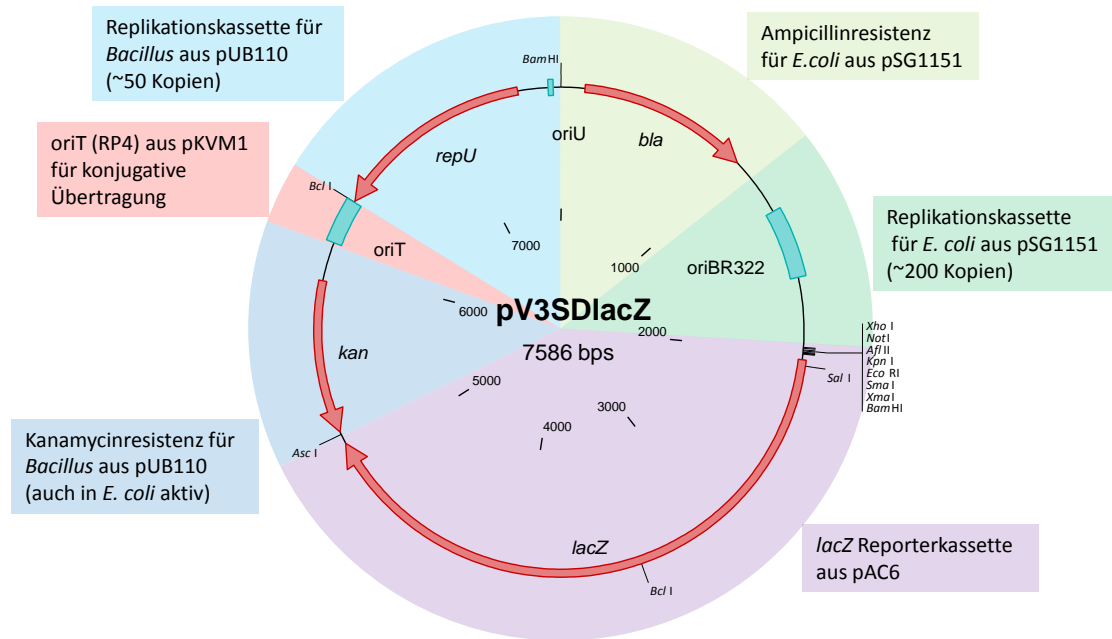


Abbildung 15: Vektorkarte des pV3SDlacZ-Vektors

Beim pV3SDlacZ-Vektor handelt es sich um einen konjugativ übertragbaren *E. coli* / *Bacillus*-Shuttle-Reportervektor. Dieser ist modular aufgebaut. Die einzelnen Elemente sind in der Darstellung mit unterschiedlichen Farben unterlegt. Beschreibungen der einzelnen Elemente sind in der Grafik abgebildet und mit der dazugehörigen Farbe markiert. Die Reporter-kassette des pAC6-Vektors trägt ein *E. coli-lacZ*-Gen. Die Aktivität eines vor die Reporter-kassette klonierten Elements kann mittels der β -Galaktosidaseaktivität ermittelt werden. Der pV3SDlacZ-Vektor basiert auf dem pV2-Vektor (siehe Abbildung 12). Der Vektor pV3lacZ unterscheidet sich vom dargestellten pV3SDlacZ durch das Fehlen der artifiziiellen RBS vor dem *lacZ*-Gen.

3.2.2.1 Promotoranalysen mittels pV3SDlacZ

Viele RNA-Moleküle wie sRNAs oder *antisense*-RNAs kodieren keine Proteine. Demnach haben diese RNA-Moleküle keine natürliche RBS. Um die Promotoraktivität und Regulation solcher Elemente untersuchen zu können, kann der Reportervektor pV3SDlacZ mit artifiziieller Ribosomenbindestelle verwendet werden. Der Vektor eignet sich auch für die Untersuchung von Promotoren proteinkodierender Gene auf transkriptioneller Ebene. Um die Funktionalität von pV3SDlacZ zu überprüfen wurden die Promotoren eines proteinkodierenden Gens (BLi_05060) sowie einer *antisense*-RNA (BLi_r1585) verwendet (siehe Abbildung 17).

Zur Amplifizierung des Promotorbereichs von BLi_05060 wurde das Oligonukleotidpaar HLRH78/79 benutzt, wobei die Schnittstellen *Xho*I und *Eco*RI an das PCR-Fragment fusioniert wurden (siehe Kapitel 2.4.1.5). Unter

Verwendung der angehängten Restriktionsschnittstellen wurde der Promotorbereich in den Vektor pV3SDlacZ kloniert (siehe Kapitel 2.4.2.2) und ergab den pV3SDlacZ_P_{BLi_05060}, welcher konjugativ in *B. licheniformis* DSM13 übertragen wurde (siehe Kapitel 2.4.2.5) und damit den Stamm *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ_P_{BLi_05060} ergab.

Zur Amplifizierung des Promotorbereichs der BLi_r1585 *antisense*-RNA wurde das Oligonukleotidpaar HLRH80/81 benutzt, wobei die Schnittstellen *Xho*I und *Eco*RI an das PCR-Fragment fusioniert wurden (siehe Kapitel 2.4.1.5). Unter Verwendung der angehängten Restriktionsschnittstellen wurde der Promotorbereich in den Vektor pV3SDlacZ kloniert (siehe Kapitel 2.4.2.2) und ergab den pV3SDlacZ_P_{BLi_r1585}, welcher konjugativ in *B. licheniformis* DSM13 übertragen wurde (siehe Kapitel 2.4.2.5) und damit den Stamm *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ_P_{BLi_r1585} ergab.

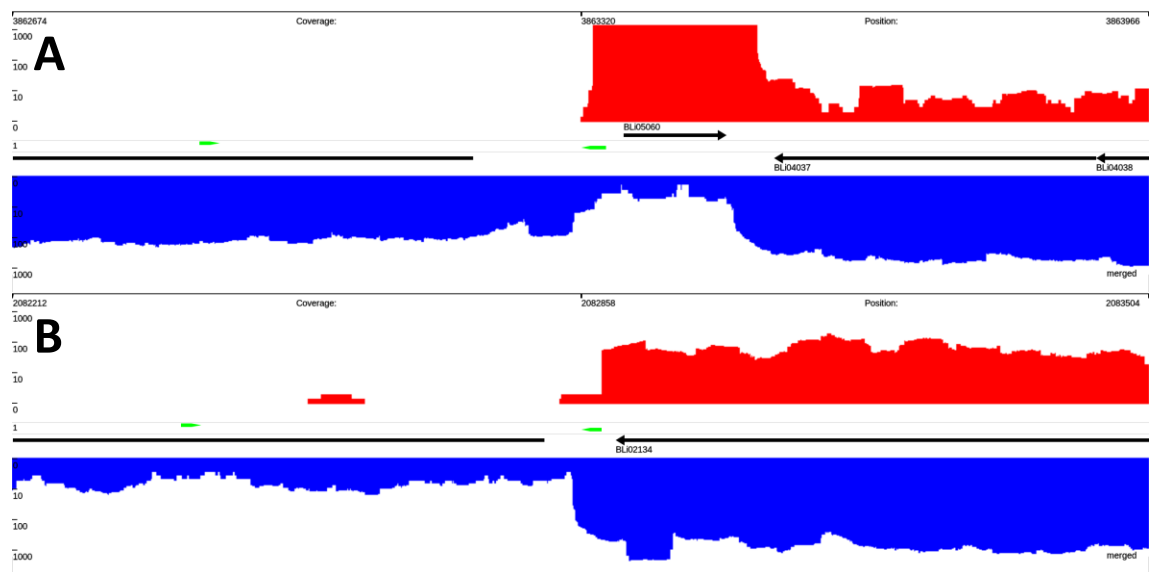


Abbildung 16: Transkriptionsprofil von BLi_05060 und BLi_r1585

Die Abbildung zeigt das mit TraV visualisierte Transkriptom von *B. licheniformis* DSM13 unter industriellen Produktionsbedingungen. Zur Verdeutlichung der Signale wurden die Sequenzen aus mehreren Replikaten vereinigt dargestellt. Die schwarzen Pfeile stellen proteinkodierende Bereiche im Genom dar. Der rote Graph symbolisiert die experimentell ermittelte transkriptionelle Aktivität auf dem Plusstrang und der blaue auf dem Minusstrang. Die grünen Pfeile markieren die Oligonukleotide mit denen die Promotorregionen amplifiziert wurden. **A:** Transkriptionelle Aktivität von BLi_05060 (rot). **B:** Transkriptionelle Aktivität von BLi_r1585 (rot). In beiden Fällen ist transkriptionelle Aktivität eindeutig zu erkennen.

Die erstellten Stämme wurden für eine β -Galaktosidase-Messung (siehe Kapitel 2.4.3.1) benutzt. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm *B. licheniformis* DSM13 und der mit dem Leervektor transformierte Stamm *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ. Die Kulturen wurden bei 37 °C angezogen. Die Ergebnisse der β -Galaktosidase-Messungen sind in Abbildung 17 dargestellt und die zugrundeliegenden Messergebnisse in Tabelle 18 im Anhang zu finden. Das Reportersystem pV3SDlacZ ist funktionell. Die Aktivität im Wildtypstamm bzw. die durch den Leervektor pV3SDlacZ generierte β -Galaktosidase Grundaktivität liegen über den gesamten Messzeitraum bei maximal 40 Miller Units. Der Vektor mit dem Promotor des proteinkodierenden Gens BLi_05060 zeigt eine kontinuierliche Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität von etwa 90 Miller Units nach 4 h Wachstum bis etwa 660 Miller Units nach 10 h Wachstum. Der Vektor mit dem Promotor des BLi_r1585 *antisense*-RNA-Gens zeigt keine kontinuierliche Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität. Hier ist nach 4 h mit etwa 200 Miller Units eine deutlich höhere β -Galaktosidase-Aktivität als beim BLi_05060 Promotorkonstrukt zu beobachten, doch wurde hier der Höhepunkt bereits nach 6 h mit etwa 430 Miller Units erreicht und reduzierte sich nach 10 h auf etwa 325 Miller Units.

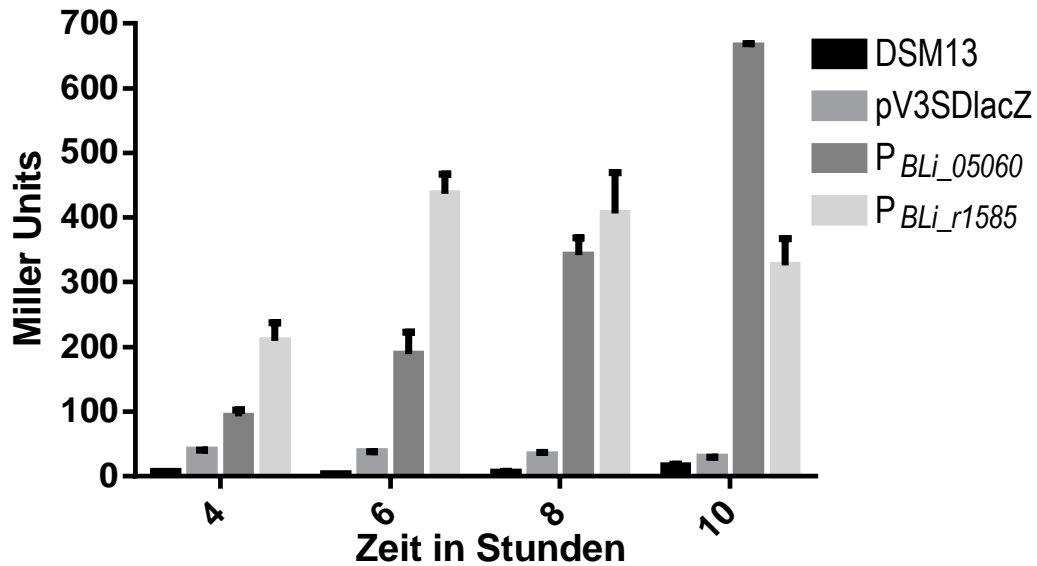


Abbildung 17: β -Galaktosidase-Aktivität der Promotoren von BLi_05060 und BLi_r1585 im pV3SDlacZ Reportersystem

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde ermittelt wie in Kapitel 2.4.3.1 beschrieben und ist in Miller Units dargestellt. Die Probennahme erfolgte nach 4, 6, 8, und 10 h. Die Stämme DSM13 = *B. licheniformis* DSM13, pV3SDlacZ = *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ, P_{BLi_05060} = *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ_P_{BLi_05060}, P_{BLi_r1585} = *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ_P_{BLi_r1585} wurden untersucht. Der Grafik zugrunde liegende β -Galaktosidase-Aktivitätswerte sind in Tabelle 18 im Anhang zu finden.

3.2.2.2 Promotoranalysen mittels pV3lacZ

Das Reportersystem pV3lacZ ist für Promotoruntersuchungen geeignet bei denen die native Ribosomenbindestelle des zu untersuchenden Gens berücksichtigt werden soll. Hierfür wird die Promotorregion inklusive der ersten kodierenden Triplets im Leseraster an das *lacZ*-Gen fusioniert. Damit reflektiert die β -Galaktosidase-Aktivität die gesamte Expressionsaktivität des betrachteten Promotors.

Der pV3lacZ Vektor wurde am Beispiel des *narGHIIJ*-Promotors aus *B. licheniformis* DSM13, welcher für eine Nitratreduktase kodiert und in *B. subtilis* 168 nachweislich unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird [158], auf seine Funktionalität überprüft. Dafür wurde mit dem Oligonukleotidpaar HLRH208/209 der *narGHIIJ*-Promotor aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* DSM13 amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.1.5). Hierbei wurden mittels Oligonukleotidüberhängen die *Xho*I- und *Sma*I-Schnittstellen an das PCR-Produkt angehängt. Diese wurden benutzt um den *narGHIIJ*-Promotor in den pV3lacZ-Vektor zu kloniert (siehe Kapitel 2.4.2.2), wobei pV3lacZ_P_{narG}

entstand. Der so erstellte Vektor wurde konjugativ auf *B. licheniformis* MW3 übertragen (siehe Kapitel 2.4.2.5), wobei der Stamm *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ_*P_{narG}* entstand. Gleichsam wurde mit dem Leervektor verfahren.

Die resultierenden Stämme wurden nach Shariat *et al.*, 1995 [109] im Minimalmedium für *Bacillus* (siehe Kapitel 2.3.4.5) aerob mit Glukose und anaerob mit Glukose und Nitrat angezogen und nach definierten Zeitabständen die Aktivität der β -Galaktosidase ermittelt.

Unter aeroben Bedingungen war die β -Galaktosidase-Aktivität für *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ_*P_{narG}* nicht entscheidend erhöht im Vergleich zu den Negativkontrollen. Die Messwerte sind in Tabelle 19 im Anhang aufgeführt.

Unter anaeroben Bedingungen war im Vergleich zu den Kontrollstämmen (*B. licheniformis* MW3 und MW3 pV3lacZ) eine stark erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität für *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ_*P_{narG}* nachweisbar (siehe Abbildung 19 und Tabelle 20). Bereits nach 2,5 h hat dieser 300 Miller Units überschritten, wobei nach 5 h mehr als 1000 und 7,5 h über 1 mio Miller Units gemessen wurden. *B. licheniformis* MW3 und MW3 pV3lacZ wiesen beide eine miteinander vergleichbare Grundaktivität von maximal 5 Miller Units über die gesamte Messdauer auf. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der Leervektor kaum β -Galaktosidase-Aktivität generiert, der *narGHJ* Promotor nur unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird und dass der pV3lacZ Vektor funktioniert. Somit konnte das pV3-*lacZ*-System unter aeroben und anaeroben Bedingungen erfolgreich eingesetzt werden.

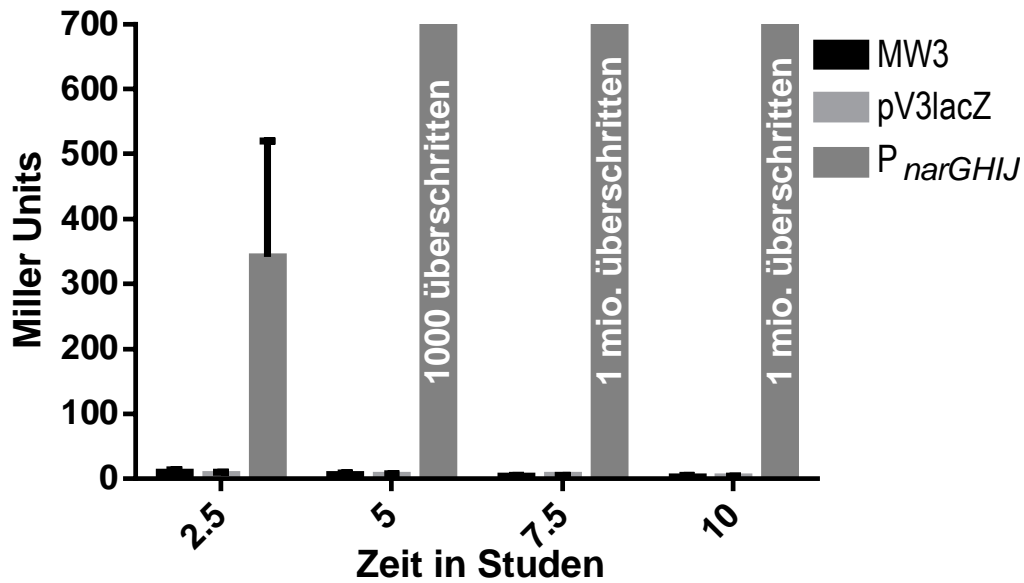


Abbildung 18: β -Galaktosidase-Aktivität des *narGHIJ*-Promotors im pV3lacZ Reportersystem unter anaeroben Bedingungen

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde ermittelt wie im Kapitel 2.4.3.1 beschrieben und ist in Miller Units dargestellt. Die Probennahme erfolgte nach 2.5, 5, 7.5, und 10 h. Die Stämme MW3 = *B. licheniformis* MW3, pV3lacZ = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ, P_{narGHIJ} = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ_P_{narGHIJ} wurden untersucht. Die zugrunde liegenden Messwerte sind in Tabelle 20 im Anhang zu finden.

3.2.3 pV3Xg

Der Vektor pV3Xg wurde für die Analyse von *cis*-regulatorischen RNA-Elementen in *B. licheniformis* konzipiert. Der Vektor basiert auf dem pV2-Vektor. Bei der Konstruktion von pV3Xg wurde auf die ligasefreie Erstellung von DNA-Konstrukten zurückgegriffen (Kapitel 2.4.1.11). Hierbei wurde mit den Oligonukleotiden HLRH35/37 (großes Fragment) und HLRH36/38 (kleines Fragment) der pV2-Vektor amplifiziert. Mit den Oligonukleotiden HLRH39/41 (großes Fragment) und HLRH40/42 (kleines Fragment) wurde das *xyIR*-Gen und der *xyIAB*-Promotor aus *B. megaterium* PV311 amplifiziert. Mit den Oligonukleotiden HLRH43/45 (großes Fragment) und HLRH44/46 (kleines Fragment) wurde das *gfp*-Gen aus pSG1151 amplifiziert. Alle drei Fragmente besaßen zu einander kompatible Überhänge und wurden in einer einzelnen Renaturierungsreaktion zu einem zirkulären Vektor zusammen gefügt und anschließend in *E. coli* transformiert (siehe Kapitel 2.4.2.2). In diesem Prozess

entstand nicht nur der pV3Xg sondern auch die in diesem Vektor verwendete Reporter-kassette (siehe Abbildung 19). Diese besteht aus dem Reporter-gen *gfp*, vor dem der *xylAB*-Promotor aus *B. megaterium* PV311 liegt, und dem zum Promotor dazugehörenden Repressorgen *xylR*. Das Vorliegen des *xylR*-Gens auf dem Vektor soll dafür sorgen, dass der daraus resultierende Xylose-repressor XylR in ausreichender Menge in der Zelle vorliegt und die Reprimierung des Xylose-promotors gewährleistet. Dieser Vektor wurde mittels Sequenzierung verifiziert und konnte aus *E. coli* und aus *B. licheniformis* MW3 erfolgreich re-isoliert werden.

Für die Untersuchung von *cis*-regulatorischen RNA-Elementen sollte das zu untersuchende RNA-Element mit den ersten proteinkodierenden Triplets des darauf folgenden Gens im Leseraster an das *gfp* Gen fusioniert werden, da dieses über keine artifizielle RBS verfügt. Dabei ist darauf zu achten, dass der natürliche Promotor der *cis*-regulatorischen RNA nicht mit kloniert wird, um sicherzustellen, dass diese nur durch den Xylose-induzierbaren Promotor exprimiert werden kann.

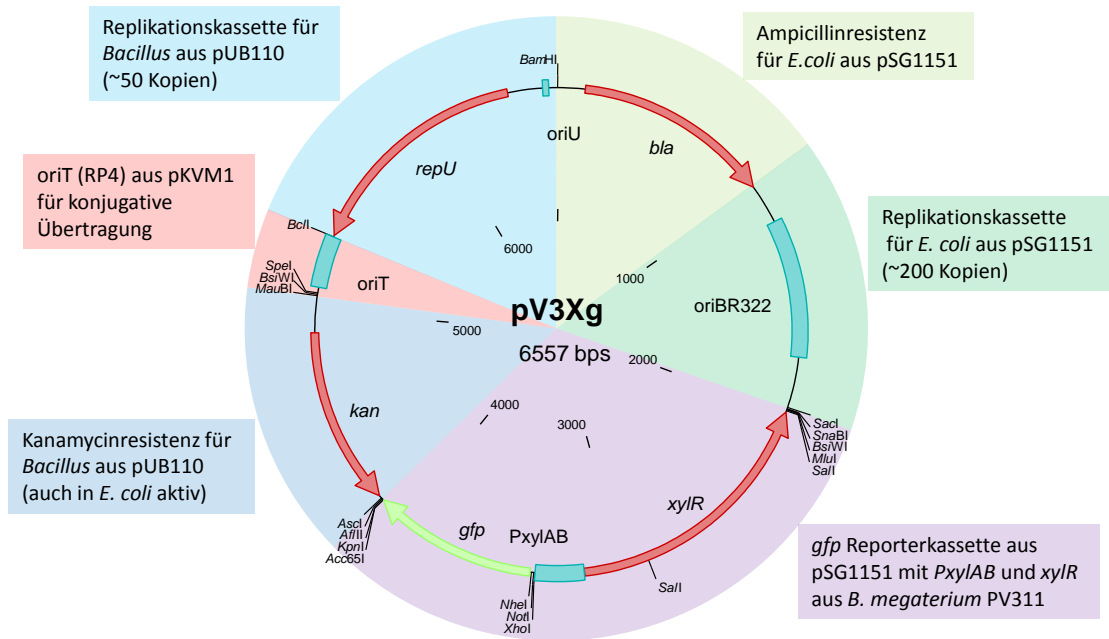


Abbildung 19: Vektorkarte des pV3Xg-Vektors

Beim pV3Xg-Vektor handelt es sich um einen konjugativ übertragbaren *E. coli* / *Bacillus*-Shuttle-Reportervektor. Dieser ist modular aufgebaut. Die einzelnen Elemente sind in der Darstellung mit unterschiedlichen Farben unterlegt. Beschreibungen der einzelnen Elemente sind in der Grafik abgebildet und mit der dazugehörigen Farbe markiert. Die mit dem Vektor neu erstellte Reporterkassette trägt das *gfpmut1*-Gen (*gfp*) aus dem pSG1151-Vektor und den Xylose-induzierbaren P_{xylAB} -Promotor aus *B. megaterium* PV311. Die Aktivität eines vor die Reporterkassette klonierten Elements kann über die GFP-Fluoreszenz verfolgt werden. Der pV3Xg-Vektor basiert auf dem pV2-Vektor (siehe Abbildung 12).

3.2.3.1 Untersuchung des *pbuG*-Riboswitch im pV3Xg-Reportersystem

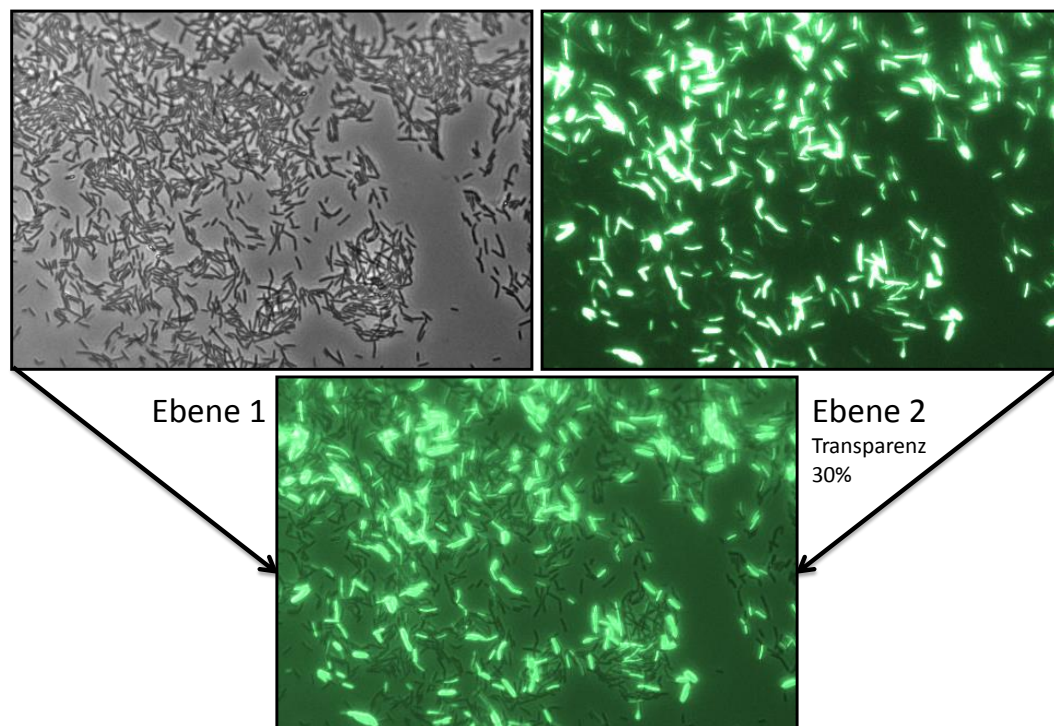
Der *gfp*-Reportervektor pV3Xg wurde am Beispiel des *pbuG*-Riboswitches aus *B. licheniformis* DSM13, der bereits in der Diplomarbeit von Christel Gaubitz experimentell untersucht wurde [159], getestet. Hierfür wurde der *pbuG*-Riboswitch mit den Oligonukleotiden HLRH83/84 aus dem Genom von *B. licheniformis* DSM13 amplifiziert und mittels der Restriktionsschnittstellen *NheI* und *XhoI* in den Vektor pV3Xg kloniert (siehe Kapitel 2.4.2.2). Der so entstandene pV3Xg_RS_{*pbuG*} und der entsprechende Leervektor wurden konjugativ in *B. licheniformis* MW3 übertragen, und so die Stämme *B. licheniformis* MW3 pV3Xg und *B. licheniformis* MW3 pV3Xg_RS_{*pbuG*} generiert. Zur Untersuchung der Funktionalität des pV3Xg-Vektors wurden die Stämme *B. licheniformis* MW3, MW3 pV3Xg und MW3 pV3Xg_RS_{*pbuG*} in LB-Medium (siehe Kapitel 2.3.4.2) als Vorkultur angezogen, mit dieser Vorkultur die Hauptkultur in

Mineralmedium (siehe Kapitel 2.3.4.4) auf eine OD_{600} 0,1 angeimpft und jeweils mit Glukose, mit Xylose, mit Glukose plus Guanodin und mit Xylose plus Guanodin angezogen und mikroskopiert. Glukose reprimiert und Xylose induziert den Xylosepromotors [160]. Die Abwesenheit von Guanodin aktiviert den *pbuG-Riboswitch*, so dass das dahinterliegende Gen transkribiert werden kann. Im Fall des pV3Xg_RS_{pbuG}-Konstrukts wird das *gfp*-Gen exprimiert. Die Anwesenheit von Guanodin sollte den *pbuG-Riboswitch* deaktivieren und das *gfp*-Gen dürfte nicht exprimiert werden [159, 161].

Die Ergebnisse der GFP-Mikroskopie sind in Tabelle 9 dargestellt. Für *B. licheniformis* MW3 und *B. licheniformis* MW3 pV3Xg konnte unter keinen Anzuchtbedingungen eine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Beim Stamm *B. licheniformis* MW3 pV3Xg_RS_{pbuG} konnte im Glukose-supplementierten Medium (Xylosepromotor reprimiert) nur vereinzelt Fluoreszenz beobachtet werden, im Xylose-supplementierten Medium (Xylosepromotor induziert) konnte eine starke Fluoreszenz beobachtet werden (siehe Abbildung 20), im Glukose- und Guanodin-supplementierten Medium (Xylosepromotor reprimiert, *pbuG-Riboswitch* aus) konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden und im Xylose- und Guanodin-supplementierten Medium (Xylosepromotor induziert, *pbuG-Riboswitch* aus) konnte nur vereinzelt Fluoreszenz beobachtet werden. Der Vektor pV3Xg war somit funktionell und für die Untersuchung von einem *cis*-regulatorischen RNA-Element, dem *pbuG-Riboswitch*, geeignet.

Tabelle 9: Fluoreszenz-Mikroskopie-Ergebnisse von *B. licheniformis* MW3 pV3Xg_RS_{pbuG}

Stamm	Medienzusatz	GFP-Fluoreszenz
MW3	D-Glukose	keine
MW3	D-Xylose	keine
MW3	D-Glukose Guanosin	keine
MW3	D-Xylose Guanosin	keine
MW3 pV3Xg	D-Glukose	keine
MW3 pV3Xg	D-Xylose	keine
MW3 pV3Xg	D-Glukose Guanosin	keine
MW3 pV3Xg	D-Xylose Guanosin	keine
MW3 pV3Xg_RS _{pbuG}	D-Glukose	vereinzelt
MW3 pV3Xg_RS _{pbuG}	D-Xylose	starke Fluoreszenz
MW3 pV3Xg_RS _{pbuG}	Glukose Guanosin	keine Fluoreszenz
MW3 pV3Xg_RS _{pbuG}	Xylose Guanosin	vereinzelt

**Abbildung 20: Fluoreszenz-Mikroskopie von *B. licheniformis* MW3 pV3Xg_RS_{pbuG}**

A: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme. B: GFP-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. C: Überlagerung der Ebene 1 (A) mit Ebene 2 (B) mit 30% Transparenz. Eine deutliche GFP-Fluoreszenz ist zu beobachten.

3.2.4 pV3g

Der pV3g Vektor basiert auf dem, im Kapitel 3.2.3 vorgestellten, pV3Xg-Vektor. Dieser nutzt auch das *gfp*-Gen als Reportergen und unterscheidet sich, von dem zugrunde liegenden System durch das Fehlen des aus *B. megaterium* PV311 stammenden Xylose-induzierbaren Promotors. Dafür wurde der pV3Xg-Vektor mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *SalI* verdaut und damit das *xylR* Gen und der *xylAB* Promotor aus dem Vektor geschnitten (siehe Kapitel 2.4.1.9). Der Restriktionsverdau wurde in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.4.1.8) und die 5171 bp-DNA-Bande unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Aufgrund der kompatiblen Überhänge der *XhoI*- und *SalI*-Schnittstellen, konnte der Vektor mittels Ligation (siehe Kapitel 2.4.1.10) wieder geschlossen und in *E. coli* transformiert werden (siehe Kapitel 2.4.2.2). Der daraus resultierende Vektor pV3g ist in Abbildung 21 dargestellt. Dieser wurde mittels Sequenzierung verifiziert und konnte aus *E. coli* und aus *B. licheniformis* MW3 erfolgreich re-isoliert werden.

Für die Untersuchung von *cis*-regulatorischen RNA-Elementen sollte das zu untersuchende RNA-Element mit den ersten proteinkodierenden Triplets des darauf folgenden Gens im Leseraster an das *gfp* Gen fusioniert werden, da dieses über keine artifizielle RBS verfügt. Dabei ist darauf zu achten, dass der natürliche Promotor der *cis*-regulatorischen RNA mit kloniert wird, da hier kein artifizieller Xylose-induzierbaren Promotor vorliegt.

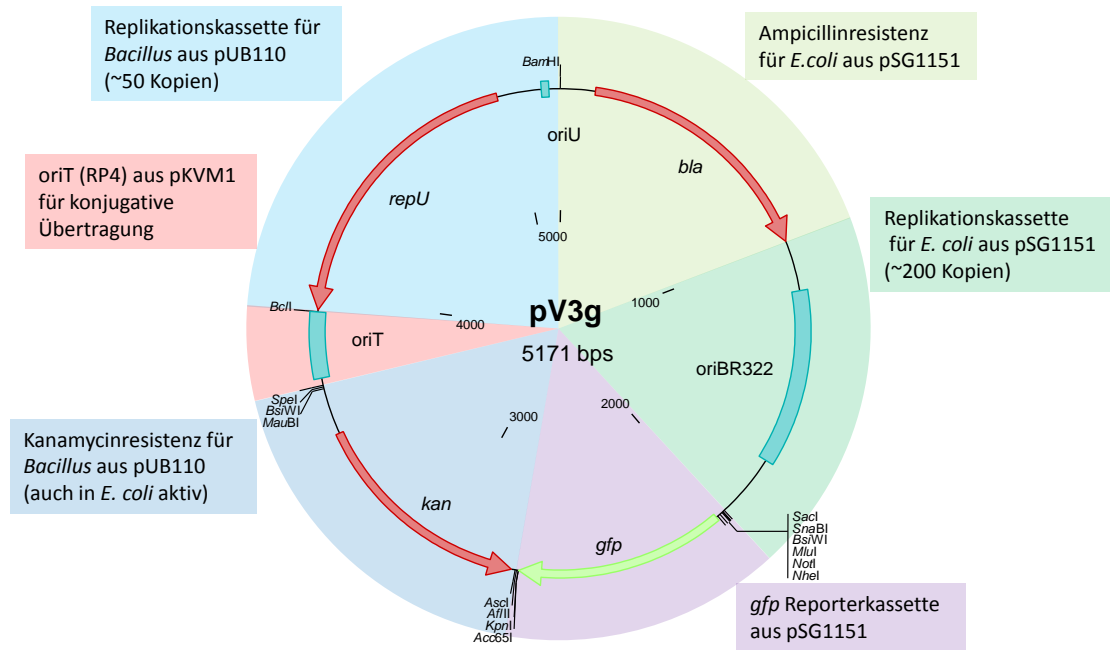


Abbildung 21: Vektorkarte des pV3g Vektors

Beim pV3g-Vektor handelt es sich um einen konjugativ übertragbaren *E. coli* / *Bacillus*-Shuttle-Reportervektor. Dieser ist modular aufgebaut. Die einzelnen Elemente sind in der Darstellung mit unterschiedlichen Farben unterlegt. Beschreibungen der einzelnen Elemente sind in der Grafik abgebildet und mit der dazugehörigen Farbe markiert. Die im Vektor eingesetzte Reporter-kassette trägt das *gfpmut1*-Gen (*gfp*) aus dem pSG1151-Vektor. Die Aktivität eines vor die Reporter-kassette klonierten Elements kann über die GFP-Fluoreszenz verfolgt werden. Der pV3g-Vektor basiert auf dem pV3Xg-Vektor (siehe Abbildung 19).

3.2.5 pV3Xb

Der pV3Xb basiert auf dem im Kapitel 3.2.3 vorgestellten pV3Xg Vektor, wobei das Reporter-gen *gfp* gegen das *bgaB*-Gen ersetzt wurde. Das *bgaB*-Gen kodiert für eine thermostabile β -Galaktosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* [162]. Mit den Oligonukleotiden HLRH55/12 wurde das *bgaB* aus pKVM1 [66] amplifiziert und dabei die Schnittstellen *XhoI* und *KpnI* an das PCR-Produkt angehängt. Sowohl der Vektor pV3Xg als auch das amplifizierte *bgaB* wurden mit *XhoI* und *KpnI* verdaut. Im Fall des pV3Xg wurde das Vektorrückrad mit einem Agarosegel aufgereinigt und anschließend mit dem vorbereiteten *bgaB*-Fragment ligiert und in *E. coli* kloniert. Der resultierende Vektor pV3Xb ist in Abbildung 22 dargestellt. Dieser wurde mittels Sequenzierung verifiziert und konnte aus *E. coli* und aus *B. licheniformis* MW3 erfolgreich re-isoliert werden.

Für die Untersuchung von *cis*-regulatorischen RNA-Elementen sollte das zu untersuchende RNA-Element mit den ersten proteinkodierenden Triplets des

darauf folgenden Gens im Leseraster an das *bgaB*-Gen fusioniert werden, da dieses über keine artifizielle RBS verfügt. Dabei ist darauf zu achten, dass der natürliche Promotor der *cis*-regulatorischen RNA nicht mit kloniert wird, um sicherzustellen, dass diese nur durch den Xylose-induzierbaren Promotor exprimiert werden kann. Da im pV3Xb-Vektor eine thermostabile β -Galaktosidase als Reporter gen eingesetzt findet, kann das erzeugte Signal analog zu den *lacZ*-Vektoren pV3SDlacZ und pV3lacZ ermittelt werden. Das dazugehörige Protokoll ist im Kapitel 2.4.3.1 beschrieben.

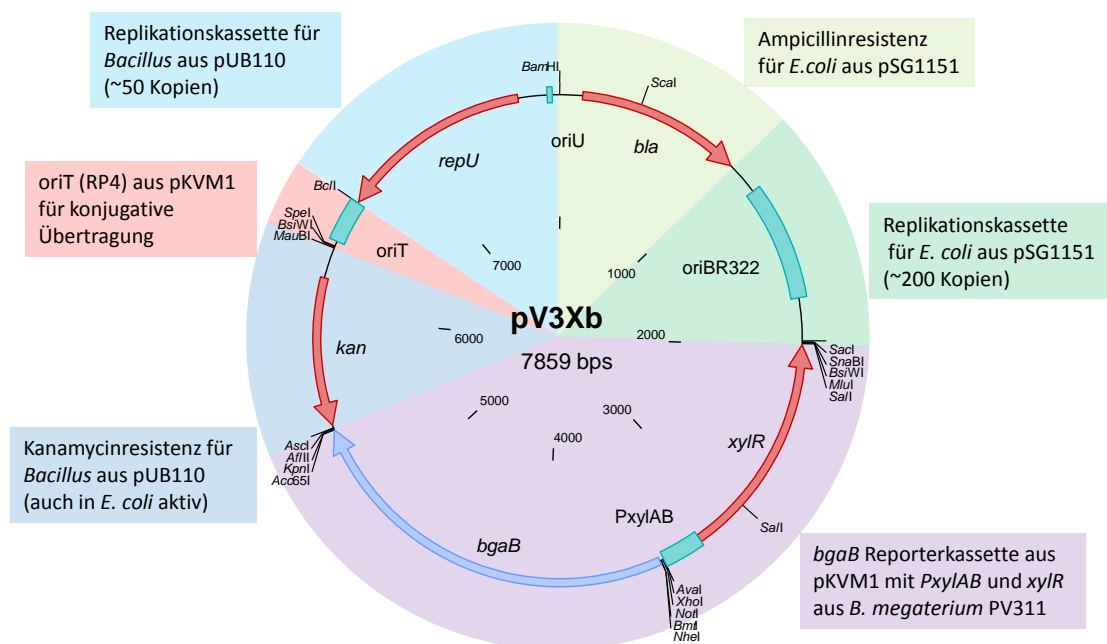


Abbildung 22: Vektorkarte des pV3Xb-Vektors

Beim pV3Xb-Vektor handelt es sich um einen konjugativ übertragbaren *E. coli* / *Bacillus*-Shuttle-Reportervektor. Dieser ist modular aufgebaut. Die einzelnen Elemente sind in der Darstellung mit unterschiedlichen Farben unterlegt. Beschreibungen der einzelnen Elemente sind in der Grafik abgebildet und mit der dazugehörigen Farbe markiert. Die mit dem Vektor neu erstellte Reporter-kassette trägt das *bgaB*-Gen aus dem pKVM1-Vektor und den Xylose-induzierbaren *P_{xylAB}*-Promotor aus *B. megaterium* PV311. Die Aktivität, eines vor die Reporter-kassette klonierten Elements, könnte mittels der β -Galaktosidaseaktivität ermittelt werden. Der pV3Xb-Vektor basiert auf dem pV3Xg-Vektor (siehe Abbildung 19)

3.2.6 pV3b

Der Vektor pV3b basiert auf dem im Kapitel 3.2.5 vorgestellten Vektor pV3Xb. Dieser nutzt auch das *bgaB*-Gen als Reportergen und unterscheidet sich von dem zugrunde liegenden System nur durch das Fehlen des aus *B. megaterium* PV311 stammenden Xylose-induzierbaren Promotors. Dafür wurde der pV3Xb-Vektor mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *SalI* verdaut, wodurch die Gene *xylR* und *PxylAB* aus dem Vektor geschnitten wurden (siehe Kapitel 2.4.1.9). Der Restriktionsverdau wurde in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.4.1.8) und die 6473 bp DNA Bande unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Aufgrund der kompatiblen Überhänge der *XhoI*- und *SalI*-Schnittstellen konnte der Vektor mittels Ligation (siehe Kapitel 2.4.1.10) wieder geschlossen und in *E. coli* transformiert werden (siehe Kapitel 2.4.2.2). Der daraus resultierende Vektor pV3b ist in Abbildung 23 dargestellt. Dieser wurde mittels Sequenzierung verifiziert und konnte aus *E. coli* und aus *B. licheniformis* MW3 erfolgreich re-isoliert werden.

Für die Untersuchung von *cis*-regulatorischen RNA-Elementen sollte das zu untersuchende RNA-Element mit den ersten proteinkodierenden Triplets des darauf folgenden Gens im Leseraster an das *bgaB* Gen fusioniert werden, da dieses über keine artifizielle RBS verfügt. Dabei ist darauf zu achten, dass der natürliche Promotor der *cis*-regulatorischen RNA mit kloniert wird, da hier kein artifizieller Xylose-induzierbarer Promotor vorliegt. Da im pV3b-Vektor eine thermostabile β -Galaktosidase als Reportergen Einsatz findet, kann das erzeugte Signal analog zu den *lacZ*-Vektoren pV3SD*lacZ* und pV3*lacZ* ermittelt werden. Das dazugehörige Protokoll ist im Kapitel 2.4.3.1 beschrieben.

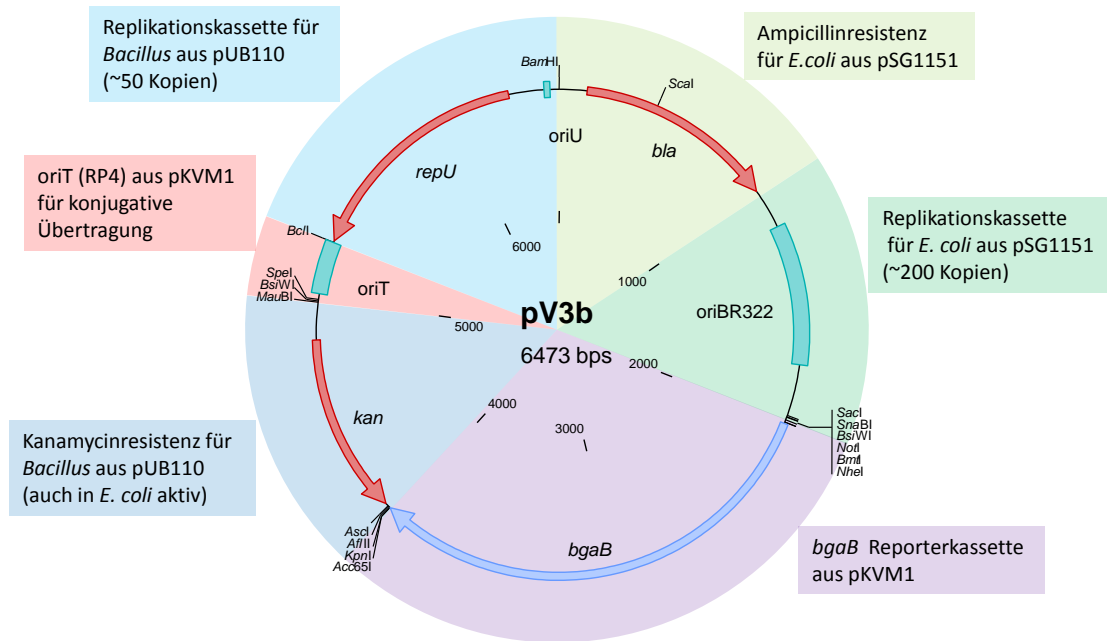


Abbildung 23: Vektorkarte des pV3b-Vektors

Beim pV3b-Vektor handelt es sich um einen konjugativ übertragbaren *E. coli* / *Bacillus Shuttle*-Reportervektor. Dieser ist modular aufgebaut. Die einzelnen Elemente sind in der Darstellung mit unterschiedlichen Farben unterlegt. Beschreibungen der einzelnen Elemente sind in der Grafik abgebildet und mit der dazugehörigen Farbe markiert. Die im Vektor eingesetzte Reporter-kassette trägt das *bgaB*-Gen aus dem pKVM1-Vektor. Die Aktivität eines vor die Reporter-kassette klonierten Elements kann mittels der β -Galaktosidaseaktivität ermittelt werden. Der pV3b-Vektor basiert auf dem pV3Xb-Vektor (siehe Abbildung 22)

3.3 Antisense-sRNA AprAs

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch die vorrangigere Transkriptomanalyse von Wiegand *et al.*, 2004 [94] identifizierte, potentiell regulatorische RNA-Elemente experimentell betrachtet werden. In der genannten Analyse ist am 3'-Ende des *apr*-Gens, das in *B. licheniformis* DSM13 für die Subtilisin-Exoprotease kodiert, einer *antisense*-sRNA beobachtet worden. Diese wird in der vorliegenden Arbeit als *aprAs* bezeichnet.

3.3.1 Erstellung der Mutante *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻

Um die Bedeutung der *cis*-lokalisierten *antisense*-sRNA AprAs (BLi_r0872) [94] zu untersuchen, wurde eine AprAs-negative Mutante erstellt (AprAs⁻). Das Transkriptionsprofil des *apr*-Gens und der *antisense*-sRNA ist in Abbildung 24 dargestellt.

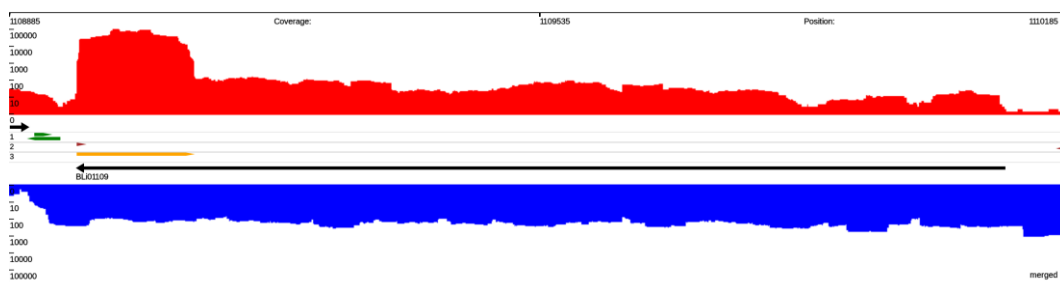


Abbildung 24: Transkriptionsprofil des *apr* Gens

In der Abbildung ist die Transkriptionsaktivität des *apr*-Locus unter industriellen Bedingungen dargestellt. Die Visualisierung erfolgte mit dem Programm TraV, welches die Transkriptomdaten logarithmisch darstellt. Zur Verdeutlichung der Signale wurden die Sequenzen aus mehreren Replikaten vereinigt dargestellt. Der rote Graph steht für die Transkriptionsaktivität auf dem Plusstrang und der blaue auf dem Minusstrang. Die transkriptionelle Aktivität der *cis*-lokalisierten *antisense*-sRNA BLi_r0872 (*aprAs*) ist demnach in rot und von *apr* in blau dargestellt. Der schwarze Pfeil (BL01109) steht für das *apr* Gen. Die grünen Pfeile symbolisieren vorhergesagte Transkriptionsterminatoren. Die kurzen braunen Pfeile stehen für experimentell ermittelte Transkriptionsstartpunkte. Der gelbe Pfeil steht für das sRNA-Gen *aprAs* mit der Größe von 144 bp.

Zur Herstellung der AprAs-negativen Mutante wurde die potentielle -10-Promotorregion durch die GC-reiche Erkennungssequenz der *AscI*-Endonuklease ausgetauscht (Abbildung 25). Zu diesem Zweck wurde der Deletionsvektor pKVM2 AprAs⁻ erstellt und zur Erzeugung des *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻

Stammes verwendet. Hierfür wurden die Oligonukleotide HLRH300/301/302/303 eingesetzt und wie im Kapitel 2.4.2.6 verfahren.

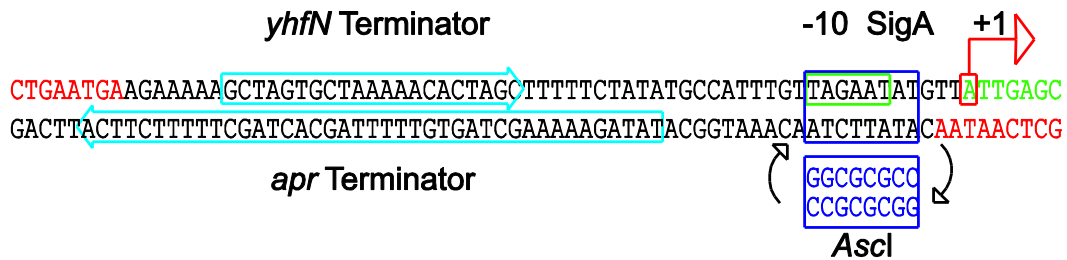


Abbildung 25: Promotorregion von *aprAs*

Die potentielle -10-Region eines SigA-Promoters ist grün umrahmt. Die ausgetauschte Sequenz ist blau umrahmt. Vorhergesagte Terminatoren sind hellblau umrahmt. Proteinkodierende Sequenz ist mit roten Buchstaben dargestellt. Die *aprAs* (Bli_r0872)-kodierende Sequenz ist mit grünen Buchstaben dargestellt. Der experimentell ermittelte Transkriptionsstartpunkt ist rot umrahmt.

Die so erstellte *B. licheniformis* MW3 *AprAs*⁻-Mutante konnte mittels Restriktionsverdau eines PCR-Fragments der Promotorregion erfolgreich bestätigt werden. Beim Nachweis mittels Restriktionsverdau handelt es sich um eine schnelle Nachweismethode, die auf der *AscI*-Erkennungssequenz basiert, welche gegen die potentielle -10-Promotorregion von *aprAs* ausgetauscht wurde. Mit dem Oligonukleotidpaar HLRH306/307 wurde ein 2,6 kbp-Fragment aus dieser Region amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.1.5) und einem *AscI*-Endonukleaseverdau unterzogen (siehe Kapitel 2.4.1.9). Beim Stamm *B. licheniformis* MW3 *AprAs*⁻ wurde das PCR-Fragment in zwei 1,3 kbp Fragmente geschnitten, lag der Wildtypzustand vor, war nach dem Verdau im Agarosegel das 2,6 kbp-Fragment zu sehen (siehe Abbildung 26). Davon unabhängig wurde die Mutante auch mittels direkter Sequenzierung verifiziert. Hierfür wurde mit den Oligonukleotiden HLRH306/307 die betreffende Region aus *B. licheniformis* MW3 *AprAs*⁻ amplifiziert und mit den Oligonukleotiden HLRH304/305/306/307 sequenziert.

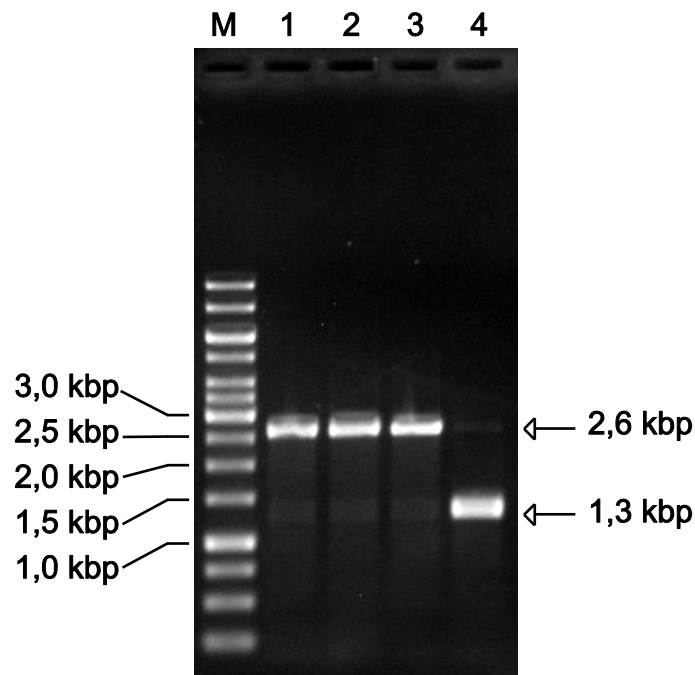


Abbildung 26: Gelelektrophorese der PCR-Kontrolle von *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻

M = GeneRuler 1 kb DNA Ladder 250 bis 10,000 bp (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland), 1 = PCR auf *B. licheniformis* MW3 chromosomaler DNA, 2 = PCR auf *B. licheniformis* MW3 chromosomaler DNA behandelt mit *AscI*, 3 = PCR auf *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ chromosomaler DNA, 4 = PCR auf *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ chromosomaler DNA behandelt mit *AscI*. Das PCR-Fragment amplifiziert auf *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ chromosomaler DNA enthält eine *AscI*-Erkennungssequenz und konnte mit der *AscI*-Endonuklease in zwei gleich große Fragmente von 1,3 kb geschnitten werden.

Außerdem wurde mittels einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde (HLRH308/309), mit Spezifität für AprAs in einem *Northern Blot*-Experiment (siehe Kapitel 2.4.5) die Abwesenheit von AprAs in *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ und die Anwesenheit in *B. licheniformis* MW3 bestätigt. Dabei konnte einerseits die erfolgreiche Erstellung einer AprAs-defizienten Mutante, sowie die Größe der AprAs-sRNA, experimentell überprüft werden (siehe Abbildung 27). Letztere wurde auf Grundlage der RNA-Sequenzdaten [94] auf 144 bp geschätzt (siehe Abbildung 24).

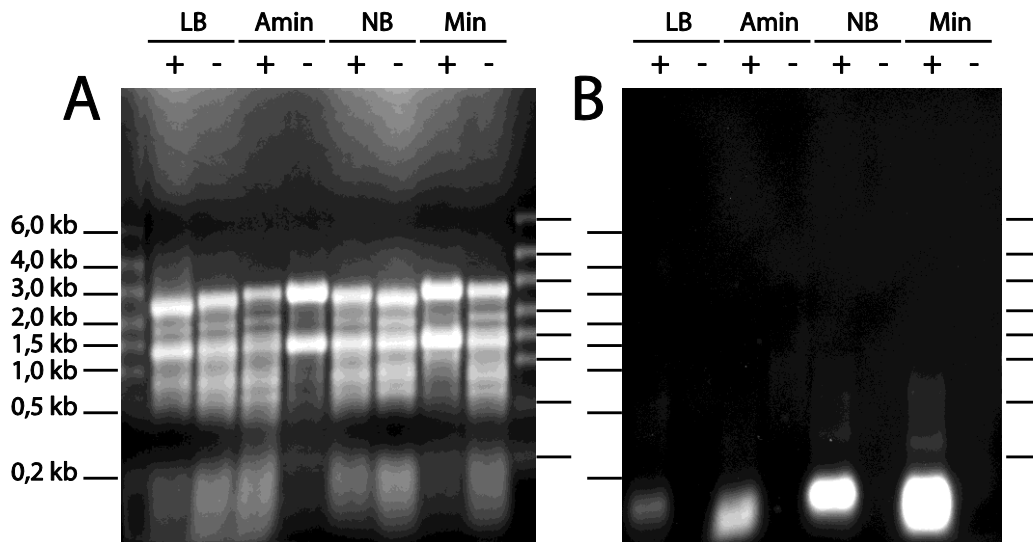


Abbildung 27: Detektion von AprAs mittels Northern Blot

LB = LB-Medium, **Amin** = Aminosäuremedium, **NB** = NB-Medium, **Min** = Mineralmedium, + = *B. licheniformis* MW3, - = *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻. Für die RNA-Präparation wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,6 geerntet. Pro Laufspur wurden 5 µg Gesamt-RNA geladen. RiboRuler High Range RNA Ladder 200 bis 6000 Basen (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) wurden als Marker verwendet. Die Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte in einem 1%-Agarose MOPS Gelsystem. **A:** Gesamt-RNA auf Nylonmembran nach einem Vakuumblot. Bei den markanten Banden bei ~ 1,4 kb und ~2,6 kb handelt es sich um die 16 S- und 23 S-rRNA. **B:** Detektion eines Northern Blots auf der in A dargestellten Nylonmembran mit fixierter Gesamt-RNA unter Verwendung einer spezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Sonde gegen AprAs. Im Stamm *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ ist kein Signal zu erkennen.

3.3.2 Proteasephänotyp von *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻

Die erstellte *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻-Mutante wurde zusammen mit dem zugrundeliegenden Stamm *B. licheniformis* MW3 auf M9 Agarplatten, supplementiert mit Milchpulver (siehe Kapitel 2.3.4.6), ausplattiert und nach einer Inkubation von 5 Tage betrachtet. Hierbei ist aufgefallen, dass die AprAs-defiziente Mutante um die Kolonie eine stärkere Klärung im trüben M9 Milchpulveragar produzierte als der zugrundeliegende Ausgangsstamm (siehe Abbildung 28). Das stärker abgebaute Milchprotein um die *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻-Mutante deutet auf eine verstärkte Exoproteaseaktivität in diesem Stamm hin.

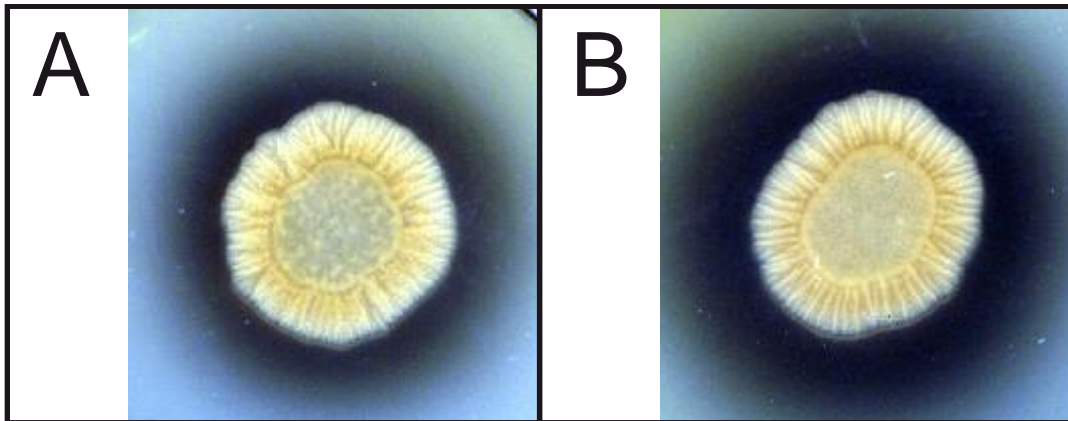


Abbildung 28: *B. licheniformis* MW3 und MW3 AprAs⁻ auf M9 Agar mit Milchpulver

A: *B. licheniformis* MW3. **B:** *B. licheniformis* MW3 aprAs⁻. Beide Stämme wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und jeweils 3 µl der Zellsuspension auf M9 Agar mit Milchpulver ausgebracht und 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Der größere Klärhof um die *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ Kolonie (B) im Vergleich zu der *B. licheniformis* MW3 Kolonie (A) deutet auf eine verstärkte Exoproteaseproduktion der AprAs⁻-defizienten Mutante hin.

Um die Exoproteaseaktivität der AprAs⁻-Mutante quantitativ zu erfassen wurde ein Protease-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.3.2). Dafür wurden beide Stämme in 4 ml M9-Medium mit Milchpulver auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert, bei 37 °C unter starkem Schütteln für 24 h angezogen und im Überstand dieser Kulturen die Exoproteaseaktivität bestimmt (siehe Kapitel 2.4.3.2). Es hat sich gezeigt, dass der Stamm *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ eine etwa vierfach stärkere proteolytische Aktivität in M9-Medium mit Milchpulver aufwies, als der zugrundeliegende *B. licheniformis* MW3 (siehe Abbildung 29). Somit sind die Proteasemessungen im Einklang mit dem beobachteten Phänotyp auf M9-Agarplatten mit Milchpulver (siehe Abbildung 28).

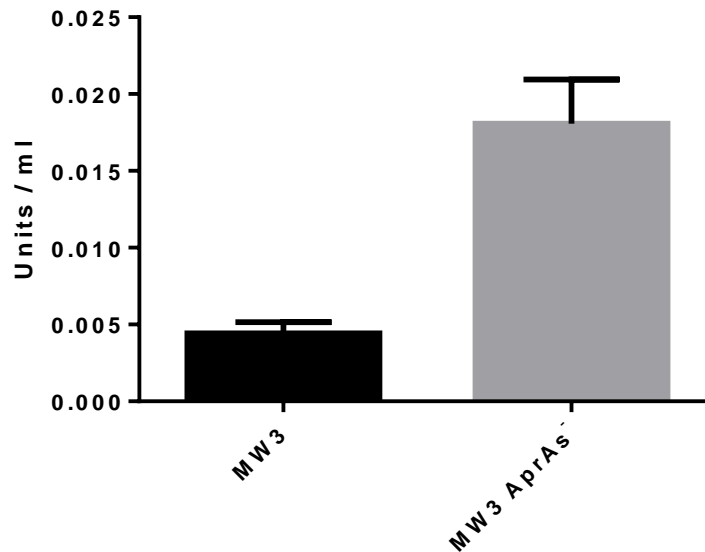


Abbildung 29: Exoproteaseaktivität von *B. licheniformis* MW3 und MW3 AprAs⁻

Die Stämme wurden in 4 ml M9-Medium mit Milchpulver (siehe Kapitel 2.3.4.6) auf eine OD600 von 0,1 inokuliert und bei 37 °C unter starkem Schütteln 24 h angezogen. Der Stamm *B. licheniformis* MW3AprAs⁻ weist in Bezug auf den Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 eine etwa viermal stärkere Exoproteaseaktivität auf. Der Grafik zugrunde liegenden Messwerte sind in Tabelle 22 im Anhang zu finden.

3.3.3 Komplementation von *B. licheniformis* MW AprAs⁻

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Zunahme der Exoproteaseaktivität in *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ sich auf die Abwesenheit von AprAs begründet und kein polarer Effekt der eingeführten Mutation ist, wurde eine Komplementation der Mutante durchgeführt. Hierbei wurde *aprAs* mit seinem nativen Promotor mit den Oligonukleotiden HLRH320/321 mittels PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.1.5) und unter Verwendung der *AscI*- und *MluI*-Endonukleasen (siehe Kapitel 2.4.1.9) in den Vektor pV2 kloniert (siehe Kapitel 2.4.2.2), wobei der Vektor pV2*aprAs* entstand. Der Vektor pV2*aprAs* und der zugrundeliegende Leervektor pV2 wurden unter Verwendung des Konjugationsstammes *E. coli* S17-1 in die Stämme *B. licheniformis* MW3 und *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ konjugativ übertragen (siehe Kapitel 2.4.2.5) und ergaben die Stämme *B. licheniformis* MW3 pV2, MW3 AprAs⁻ pV2, MW3 pV2*aprAs* und MW3 AprAs⁻ pV2*aprAs*. Die erfolgreiche Transkription von *aprAs* vom Vektor pV2*aprAs* wurde mittels einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde,

mit Spezifität für AprAs, in einem *Northern Blot*-Experiment (siehe Kapitel 2.4.5) bestätigt (siehe Abbildung 30).

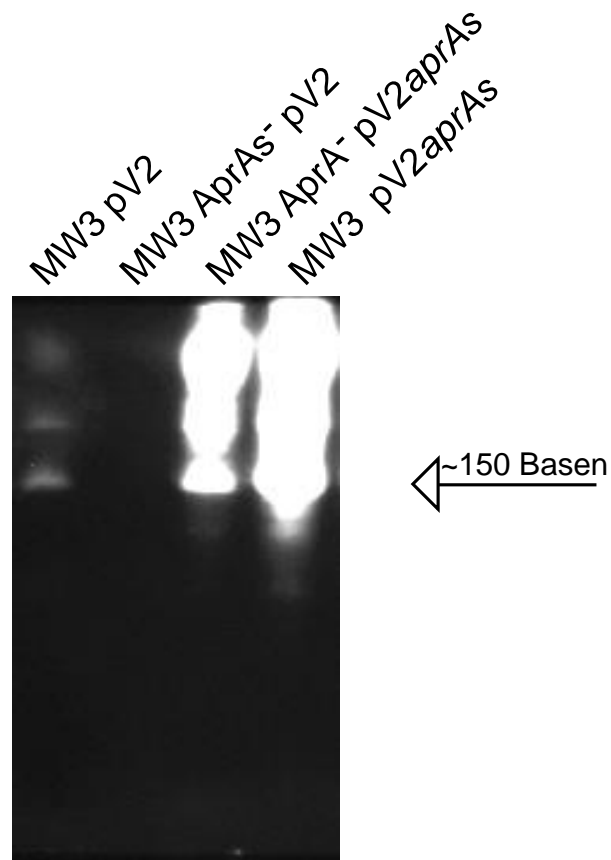


Abbildung 30: Nachweis der AprAs-Komplementation mittels *Northern Blot*

Die Größenabschätzung erfolgte mittels der Xylencyanol-Laufbande. Zellen für die RNA-Präparation wurde in 4 ml M9-Medium supplementiert mit Milchpulver (siehe Kapitel 2.3.4.6) auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und bei 37 °C unter starkem Schütteln 24 h angezogen. Auf das Polyacrylamid-Gel wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die verwendete Digoxigenin-markierte RNA-Sonde war spezifisch gegen AprAs. Die einzelnen Laufspuren sind mit den Stammbezeichnungen der verwendeten *B. licheniformis* Stämme beschriftet. *B. licheniformis* MW3 pV2 weist ein Signal auf. *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ weist kein Signal auf. Die Stämme *B. licheniformis* MW3 pV2aprAs und *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ pV2aprAs weisen ein starkes Signal auf, was die Transkription der *aprAs* sRNA vom pV2aprAs Vektor verifiziert.

Die komplementierten Stämme und die entsprechenden Kontrollstämme wurden in 4 ml M9-Medium mit Milchpulver (siehe Kapitel 2.3.4.6) auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und bei 37 °C unter starkem Schütteln für 24 h angezogen. Von diesen Kulturen wurde im Überstand die Exoproteaseaktivität bestimmt (siehe Kapitel 2.4.3.2). Die Exoproteaseaktivität von *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ pV2aprAs entsprach der von *B. licheniformis* MW3. Die Proteaseaktivität von

B. licheniformis MW3 pV2aprAs war niedriger als die von *B. licheniformis* MW3. Dieses Experiment zeigt, dass die Abwesenheit der sRNA AprAs in *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ für die verstärkte Exoproteaseaktivität dieses Stammes verantwortlich ist. Durch die Expression von AprAs vom Vektor pV2aprAs konnte die natürliche proteolytische Aktivität wiederhergestellt werden. Somit handelt es sich um keinen polaren Effekt. Die zusätzliche Expression von AprAs, in *B. licheniformis* MW3 pV2aprAs, konnte die Exoproteaseaktivität in diesem Stamm unter die des zugrundeliegenden Stammes *B. licheniformis* MW3 reduzieren (siehe Abbildung 31).

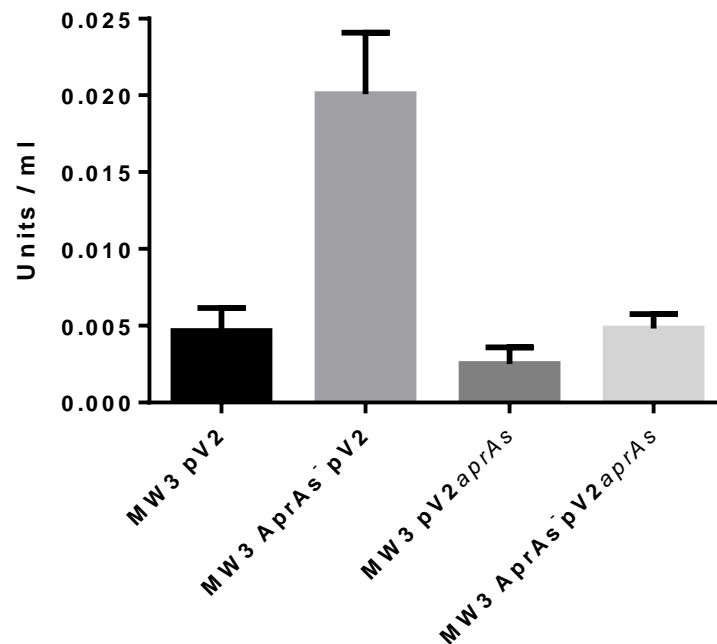


Abbildung 31: Proteaseaktivität der AprAs-Komplementationsmutanten und Kontrollen

Die *B. licheniformis*-Stämme wurden in 4 ml M9 Medium supplementiert mit Milchpulver auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C unter starkem Schütteln 24 h angezogen. Die Kontrollstämme MW3 pV2 und MW3AprAs⁻ pV2 wurden verwendet um einen Effekt durch den pV2-Vektor auszuschließen. Die Komplementationsmutanten zeigen im Vergleich zu den Stämmen mit dem Leervektor pV2 einen Abfall der Exoproteaseaktivität, in *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ pV2aprAs auf das Niveau von MW3 pV2, und bei *B. licheniformis* MW3 pV2aprAs unter das Niveau von *B. licheniformis* MW3 pV2. Der Grafik zugrunde liegenden Messwerte sind in Tabelle 23 im Anhang zu finden.

3.4 *Cis*-regulatorische RNA-Elemente in *B. licheniformis* DSM13

Zur weiteren Analyse der durch die vorrangigere Transkriptomanalyse von Wiegand *et al.*, 2004 [94] identifizierten, potentiell regulatorischen RNA-Elemente wurde ein Schwerpunkt auf *cis*-regulatorische RNA-Elemente gelegt. Prominenter Vertreter dieser Klasse sind *Riboswitches*. Diese sind oft mit Genen des Zellmetabolismus assoziiert [75] und bieten somit einen guten Ansatzpunkt für potentielle Stammoptimierungen.

3.4.1 Sortierkriterien für *cis*-regulatorische RNA-Elemente

Bei der Transkriptomanalyse von *B. licheniformis* konnten 1380 5'UTRs identifiziert werden [94]. Zur Ermittlung von potentiell neuen *Riboswitches* wurde zuerst eine Sortierung nach Größe und transkriptioneller Abdeckung durchgeführt, da die RNA-Struktur eines *Riboswitches* eine minimale 5'UTR-Länge voraussetzt [74] und der *Riboswitch* stärker transkribiert sein sollte, als die durch ihn regulierte mRNA. Hierbei wiesen 422 5'UTRs eine Größe von über 100 bp (gewählter *cutoff*) auf und davon hatten 124 eine Transkriptabdeckung von mindestens 110% im Vergleich zu dem folgenden kodierenden Bereich. Da *Riboswitches* oft durch die Transkriptionstermination mittels eines intrinsischen Terminator regulieren [75], wurde als nächstes nach diesem gesucht (siehe Kapitel 2.7.2). Von den 124 5'UTRs hatten 52 einen bioinformatisch vorhergesagten intrinsischen Transkriptionsterminator. Zur Evaluation dieser Sortierung wurde der Gehalt an durch Rfam bioinformatisch vorhergesagten Strukturelementen [94], in den einzelnen Ebenen analysiert. Der Verlauf ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Rfam stellt Kovarianzmodelle bereits untersuchter RNA-Regulatoren zur Verfügung und ermöglicht so eine Identifizierung dieser bekannten Regulatoren im untersuchten Genom.

Tabelle 10: Sortierung der 5'UTRs aus *B. licheniformis* DSM13

Sortierkriterien	5'UTRs	Vorhergesagte <i>cis</i> -regulatorische Elemente
Gesamtheit	1380	44
>100bp	422	43
≥110% Transkriptabdeckung	124	41
5'UTR / Gene		
intrinsic	52	38
Transkriptionsterminator		

Tabelle 10 zeigt, dass die angewandten Kriterien die Zahl der 5'UTRs deutlich, auf 3,7%, reduzieren konnten und dabei 86,4% der vorhergesagten *cis*-regulatorischen Elemente in sich konzentrierte. Nach Abzug der mit Rfam vorhergesagten Strukturelemente von den finalen 52 5'UTRs, bleiben 14 potentielle Kandidaten für neue *cis*-regulatorische Elemente.

Ein *Riboswitch* der sich in einer permanenten „aus“ Konformation befindet, könnte ein Transkriptionsmuster erzeugen, das sich als ein kleines, von einer mRNA unabhängiges, Transkript präsentiert. Tatsächlich ist der *Riboswitch* der Lichenysinsynthetase nicht als 5'UTR klassifiziert, sondern als unabhängiges RNA-Transkript [94]. Aus diesem Grund wurden freie RNA-Elemente, die unabhängig von einer mRNA transkribiert sind, in diese Untersuchung aufgenommen. Da es sich um eine weitere RNA-Klasse handelt, wurden die Sortierkriterien im Folgenden an diese angepasst.

Im Transkriptom von *B. licheniformis* DSM13 wurden 53 frei RNA-Elemente identifiziert und als "indep" gekennzeichnet [94]. Hierbei waren 31 von 51 mit dem Folge-Gen auf dem gleichen Strang, also in *cis* orientiert. Bei 13 aus 31 war am Folge-Gen keine alternative Transkriptionsstartstelle (TSS) [94] zu beobachten, so dass eine unabhängige Transkription des Folge-Gens nicht zu erwarten ist. Von den 13 Elementen beinhalteten 10 einen vorhergesagten intrinsic Transkriptionsterminator. Der Verlauf dieser Sortierung ist in Tabelle 11 zu sehen.

Tabelle 11: Sortierung der indep RNA-Elemente aus *B. licheniformis* DSM13

Sortierkriterien	indep RNA- Elemente	Vorhergesagte <i>cis</i>- regulatorische Elemente
Gesamtheit	53	1
<i>Cis</i> -Orientierung zum Folge-Gen	36	1
keine TSS zwischen RNA-Element und Folge-Gen	13	1
intrinsischer Transkriptionsterminator	10	1

Zusammengenommen ergeben sich aus den beiden Sortierungen 23 Kandidaten für neue *cis*-regulatorische Einheiten. Diese wurden manuell evaluiert, wobei artifizielle 5'UTR (nur minimal über der Hintergrundexpression), in Prophagenbereichen liegende RNA-Elemente und Bereiche mit einer komplexen Regulation ausgeschlossen wurden. Somit konnte die Kandidatenliste auf 14 finale Kandidaten reduziert werden (Tabelle 12). Um sicherzustellen, dass es sich bei den 14 Kandidaten nicht um proteinkodierende mRNAs handelt wurden die Kandidaten gegen die Swissprot und InterPro Datenbanken abgeglichen (siehe Kapitel 2.7.3). Es gab keine Hinweise auf proteinkodierende Abschnitte.

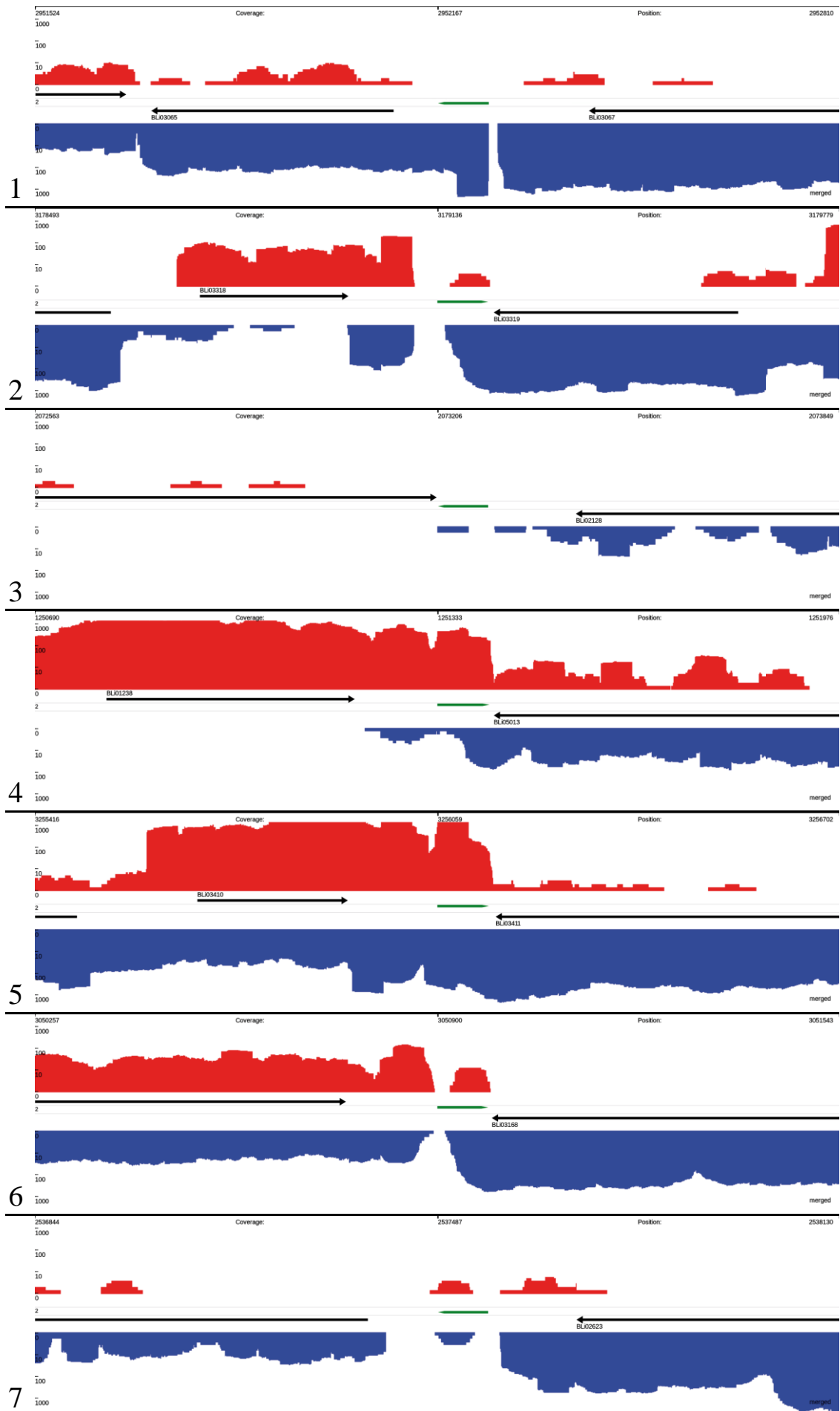
Tabelle 12: Kandidaten für *cis*-regulatorische Elemente

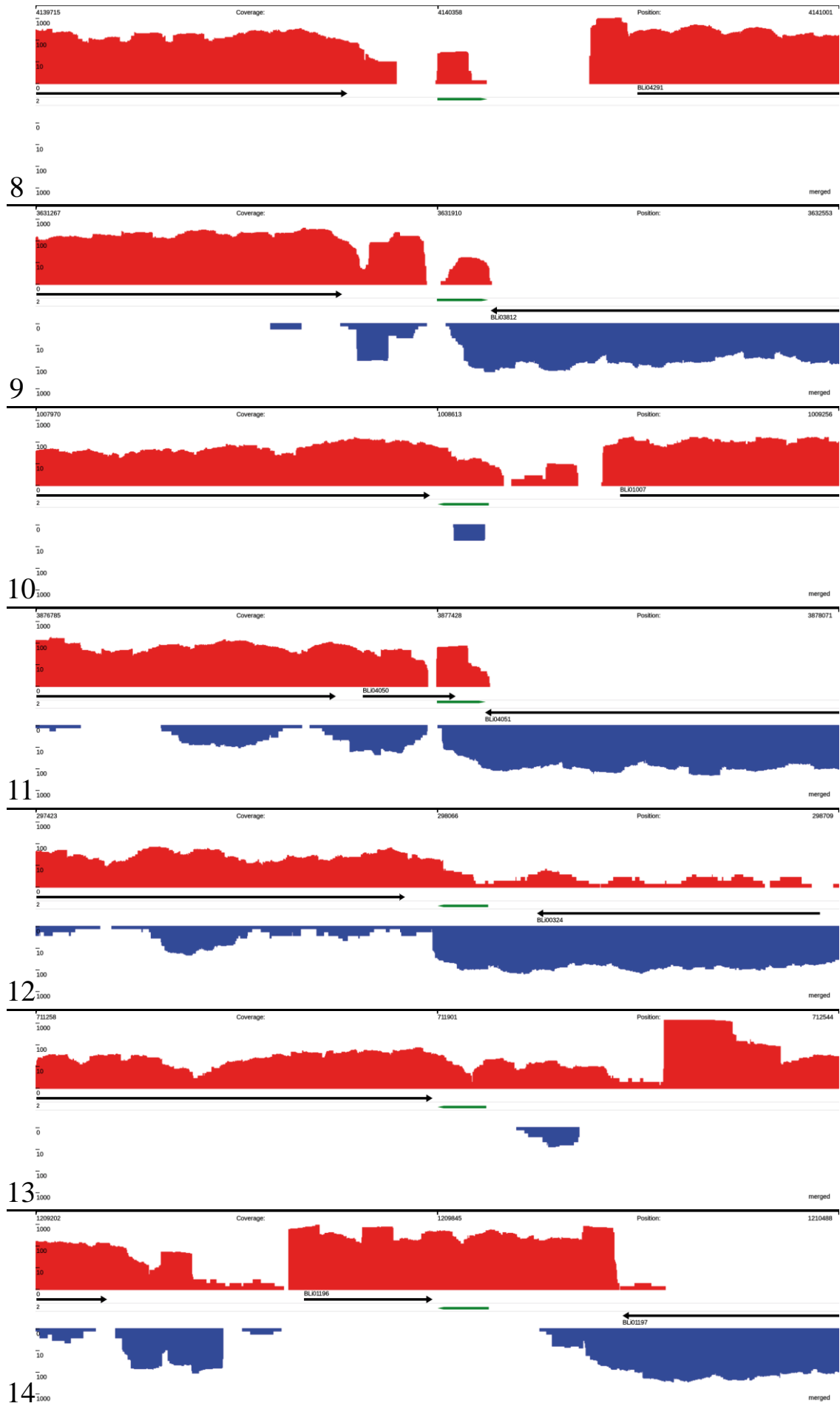
RNA Tag	RNA-Art	Größe	Gen Tag*	Annotation dahinterliegender Gene*
BLi_r0086	indep	156	BLi00235	hypothetical protein
			BLi00236	hypothetical protein
			BLi00237	hypothetical protein
BLi_r0142	indep	277	BLi00298	putative macrolide 2'-phosphotransferase YcbJ
BLi_r0484	indep	104	BLi00686	GMP synthase GuaA
BLi_r0735	indep	251	BLi00989	putative ABC transporter ATP-binding protein
BLi_r0736	indep	147	BLi00990	Format/nitrate transporter YrhG (membran protein)
BLi_r0784	5'UTR	199	BLi01028	hypothetical protein YhdT
BLi_r1233	indep	82	BLi01593	Zinc-transporting ATPase ZosA (membran protein)
BLi_r1634	5'UTR	304	BLi02182	putativ ABC transporter ATP-binding protein
BLi_r1657	5'UTR	110	BLi02210	hypothetical protein
BLi_r2066	5'UTR	188	BLi02766	formate dehydrogenase YrhE
			BLi02767	hypothetical protein YrhD
BLi_r2291	5'UTR	153	BLi03065	transmembrane protein YtzA
BLi_r3061	5'UTR	195	BLi04035	hypothetical protein
			BLi04034	hypothetical protein
			BLi04033	putative asparagine synthase
			BLi04032	ABC transporter ATP-binding protein
			BLi04031	ABC transporter transmembran domain
			BLi04030	putative Acyl-CoA N-acyltransferase
			BLi04029	putative protease
BLi_r3226	indep	179	BLi04257	putative ABC exporter ATP-binding protein YfmM2
BLi_r3296	5'UTR	158	BLi04355	transmembrane protein YybS
			BLi04354	c-di-AMP phosphodiesterase GdpD
			BLi04353	ribosomal protein L9 RplI

* Wenn sich auf Grundlage der Transkriptomdaten ein Operon hinter einem RNA-Element abzeichnete, so wurden alle Gene mit ihrer Annotation in die Tabelle aufgenommen.

3.4.2 Strukturverwandte Elemente identifizierter Kandidaten für *cis*-regulatorische RNAs

Cis-regulatorische Elemente, wie *Riboswitches* können in mehreren Kopien in einem Genom vorkommen [163, 164]. Diese zeigen auf Sequenzebene oft wenig Ähnlichkeit, sind aber in ihrer Sekundärstruktur konserviert. Ein weiteres Merkmal ist ihre phylogenetische Konservierung. Die genannten Eigenschaften wurde bereits, unter Zuhilfenahme von Kovarianzmodellen, bei der bioinformatischen Suche nach *cis*-regulatorischen Elementen erfolgreich genutzt und zugleich bestätigt [92, 165–167]. Die genannte Herangehensweise mit Kovarianzmodellen wurde, bei der Analyse der in dieser Arbeit identifizierten Kandidaten für neue *cis*-regulatorische Elemente, angewandt. Die Suche mit den erstellten Kovarianzmodellen (siehe Kapitel 2.7.4) im *B. licheniformis* DSM13 Genom ergab für 12 von 14 Kandidaten ausschließlich Treffer auf die für die Erstellung der Modelle verwendeten Instanzen. Das BLi_r0735 RNA-Element hatte neben dem Treffer auf die eigene Ursprungssequenz auch einen Treffer auf das BLi_r3226 RNA-Element. Das Kovarianzmodell des BLi_r3226 RNA-Elements hingegen war nur fähig die eigene Ursprungssequenz zu identifizieren. In beiden Fällen handelte es sich beim assoziierten Gen um ein ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters. Mit 16 Treffern lieferte das Kovarianzmodell von BLi_r2291 eine deutlich höhere Anzahl. Diese Treffer liegen überwiegend im 3'UTR-Bereichen bzw. *antisense* zum 3'UTR-Bereich verschiedener Gene. Ein Abgleich mit den Transkriptomdaten von *B. licheniformis* DSM13 offenbarte, dass die meisten Treffer in Bereichen mit transkriptioneller Aktivität liegen. In Abbildung 32 sind die Treffer des BLi_r2291 Kovarianzmodells im Transkriptomdatensatz von *B. licheniformis* DSM13 zu sehen.





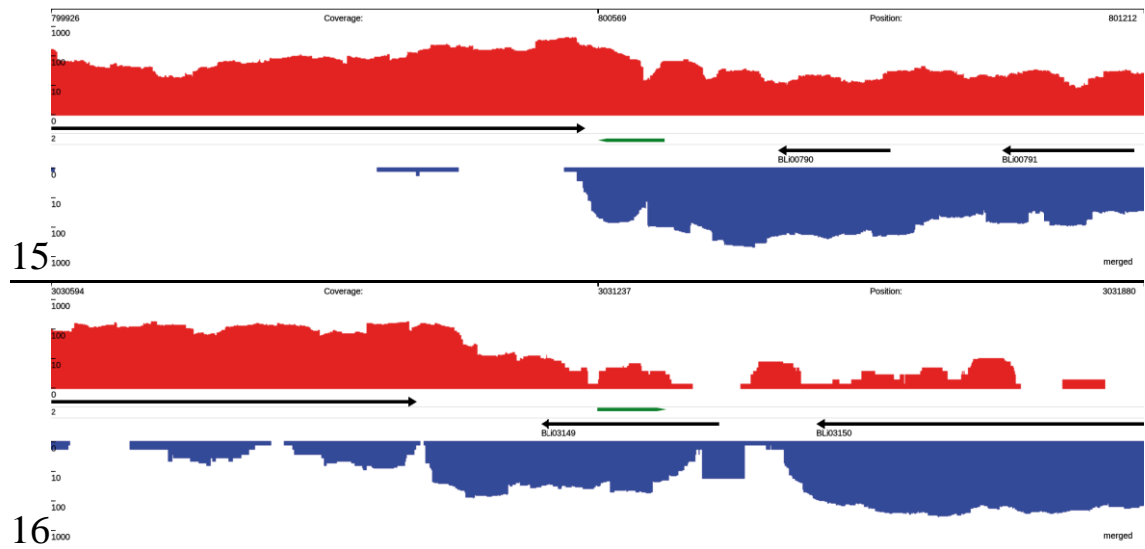


Abbildung 32: Transkription der BLi_r2291 Instanzen im Genom von *B. licheniformis* DSM13

Die Abbildung zeigt Ausschnitte des mit TraV visualisierten Transkriptom von *B. licheniformis* DSM13 unter industriellen Produktionsbedingungen. Zur Verdeutlichung der Signale wurden die Sequenzen aus mehreren Replikaten vereinigt dargestellt. Die schwarzen Pfeile stellen proteinkodierende Bereiche im Genom dar. Der rote Graph symbolisiert die experimentell ermittelte transkriptionelle Aktivität auf dem Plusstrang und der blaue auf dem Minusstrang. Der grüne Pfeil symbolisiert Instanzen der BLi_r2291 sRNA, die mittels Kovarianzmodells identifiziert wurden. Die Einzelabbildungen sind nach der Priorität der Kovarianzmodell-Treffer geordnet.

Die Anwendung der Kovarianzmodelle auf 17 *B. licheniformis*-Genome (siehe Tabelle 6) ergab die in Tabelle 13 dargestellten Ergebnis. Abgesehen von den Mehrfachtreffern der BLi_r0735 und BLi_r2291 Kovarianzmodelle sind auch Mehrfachtreffer des BLi_r0142 Kovarianzmodells beobachtet worden. Weiterhin konnten die Genome anhand der Verteilung der Kovarianzmodell-Treffer in drei Gruppen aufgeteilt werden. In der ersten Gruppe ergaben alle Kovarianzmodelle mindestens einen Treffer, nur die Trefferzahl von BLi_r2291 lag bei 15-16. In der zweiten Gruppe fehlt ein Treffer des BLi_r0086 Kovarianzmodells und die Trefferanzahl von BLi_r2291 stieg bei manchen Stämmen auf bis zu 22. In der dritten Gruppe fehlten Treffer der BLi_r0086, BLi_r1233 und BLi_r3061 Kovarianzmodelle. Das Kovarianzmodell von BLi_r0736 lieferte in der dritten Gruppe nur bei einem von drei Stämmen Treffer. Die Trefferzahl von BLi_r2291 lag hier bei 6 bis 9.

Tabelle 13: Treffer der Kovarianzmodelle von 14 potentiellen *cis*-regulatorischen RNA-Elementen in 17 *B. licheniformis* Genomen

RNA tag	DSM13	BAE	10-1-A	5-2-D	MB3	603	8785	9945A	MB1	MB2	MB4	SP1	WX-02	1969	12369	12370	1913	total
BLi_r0086	1	1	1	1	1													5
BLi_r0142	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	28
BLi_r0484	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17
BLi_r0735	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	31
BLi_r0736	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1		15
BLi_r0784	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17
BLi_r1233	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				14
BLi_r1634	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17
BLi_r1657	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17
BLi_r2066	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17
BLi_r2291	16	16	15	15	16	20	16	20	22	20	16	16	13	17	7	6	9	260
BLi_r3061	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				14
BLi_r3226	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17
BLi_r3296	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17

Die Anwendung der erstellten Kovarianzmodelle auf eine Auswahl von Mitgliedern der Subtilis-Gruppe, der Cereus-Gruppe und weiterer *Bacillus* Stämme verdeutlicht die Konservierung der potentiellen regulatorischen RNA-Elemente (siehe Tabelle 14). An Hand der Treffer der mit Kovarianzmodellen identifizierten Instanzen der RNA-Elemente konnte die Subtilis-Gruppe in 4 Einheiten aufgeteilt werden. Die erste Subgruppe besteht aus *B. licheniformis* DSM13 und 9945A, für welche fast alle Kovarianzmodelle einen Treffer lieferten. Die zweite Subgruppe besteht aus Stämmen von *B. subtilis* und *B. atrophaeus*. Hier lieferten 9 Kovarianzmodelle keine Treffer. Wenn Treffer vorlagen, waren diese in der Anzahl konsistent mit *B. licheniformis* DSM13. Eine Ausnahme stellt auch hier das BLi_r2291 RNA-Element dar. Es ist deutlich eine Reduzierung der Treffer zu erkennen, wobei diese bei den beiden *B. subtilis* Stämmen auf 8 bis 9 Treffer absanken und bei *B. atrophaeus* bis auf einen Treffer. In der dritten Subgruppe, bestehend aus *B. pumilus* Stämmen, trafen nur die Kovarianzmodelle von BLi_r0784 und BLi_r2291. Bei letzterem stieg die Anzahl auf bis zu 78 an. Die vierte Subgruppe, bestehend aus zwei *B. amyloliquefaciens*-Vertretern, zeigte

wieder Treffer mehrerer Kovarianzmodelle, wobei hier auffällig war, dass kein Treffer für BLi_r2291 vorlag.

In der *Cereus*-Gruppe nahm die Trefferanzahl allgemein ab. Unter den weiteren *Bacillus*-Arten kam es nur noch vereinzelt zu Treffern oder wie bei *B. pseudofirmus* OF4, *B. selenitireducens* MLS10 und *B. coagulans* 2-6, zu keinen Treffern (nicht gezeigt). In der *Cereus*-Gruppe und den weiteren Bacillen gab es keinen einzigen Treffer des BLi_r2291 Kovarianzmodells, welches in der *Subtilis*-Gruppe sehr viele Instanzen fand.

Tabelle 14: Treffer der Kovarianzmodelle von 14 potentiellen regulatorischen RNA-Elementen in 25 *Bacillus* Genomen.

RNA tag	<i>B. licheniformis</i> DSM13	<i>B. licheniformis</i> 9945A	<i>B. subtilis</i> W23	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. atrophaeus</i> 1942	<i>B. pumilus</i> S1	<i>B. pumilus</i> SAFR-032	<i>B. pumilus</i> DSM27	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>B. cereus</i> ATCC14579	<i>B. thuringiensis</i> Ames	<i>B. thuringiensis</i> BMB171	<i>B. pseudomycoloides</i> ATCC10792	<i>B. mycoloides</i> DSM12442	<i>B. weihenstephanensis</i> DSM2048	<i>B. cytotoxicus</i> NVH 391-98	<i>B. megaterium</i> DSM319	<i>B. clausii</i> KSM-K16	<i>B. halodurans</i> C-125
BLi_r0086	1																			
BLi_r0142	1	2	1	1	1			1	1	2	1	2	2	1	1	2				1
BLi_r0484	1	1																		
BLi_r0735	2	2									1	1	1	1	1	1		1	1	1
BLi_r0736	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1				1			
BLi_r0784	1	1	1	1	1	1	1	1	1											
BLi_r1233	1	1																		
BLi_r1634	1	1																		
BLi_r1657	1	1																		
BLi_r2066	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1				1			
BLi_r2291	16	20	8	9	1	78	65	56												
BLi_r3061	1	1																		
BLi_r3226	1	1										1	1	1	1					
BLi_r3296	1	1																		
	Subtilis Gruppe							Cereus Gruppe							weitere					

Die Stämme *B. pseudofirmus* OF4, *B. selenitireducens* MLS10 und *B. coagulans* 2-6 sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da sie keinen Treffer der hier angewandten Kovarianzmodelle hatten.

Das Experiment zeigt, dass es sich bei den hier ausgewählten *cis*-regulatorischen Elementen auch um solche handelt, da die Treffen der Kovarianzmodelle fast ausschließlich in *cis*-Orientierung zum Folge-Gen gefunden wurden. Als einzige Ausnahme kann das RNA-Element BLi_r2291 benannt werden.

3.4.3 Verteilung von BLi_r2291 in der *B. licheniformis*-Gruppe

Bei der Untersuchung der potentiellen *cis*-regulatorischen Elemente mittels Kovarianzmodell ist BLi_r2291 aufgefallen. Im Genom von *B. licheniformis* DSM13 konnten 16 Instanzen identifiziert werden (siehe Abbildung 32). Ein *Alignment* zeigte, dass diese Instanzen in ihrer Sequenz und möglichen Sekundärstruktur konserviert sind (siehe Abbildung 33). Lediglich der 3'-Abschnitt ist nicht konserviert.

Organisation gemäß dem *Multilocus sequence typing* (MLST)-Schema nach Madslie *et al.*, 2012 [146] (siehe Kapitel 2.7.5) korrelierte (siehe Abbildung 34).

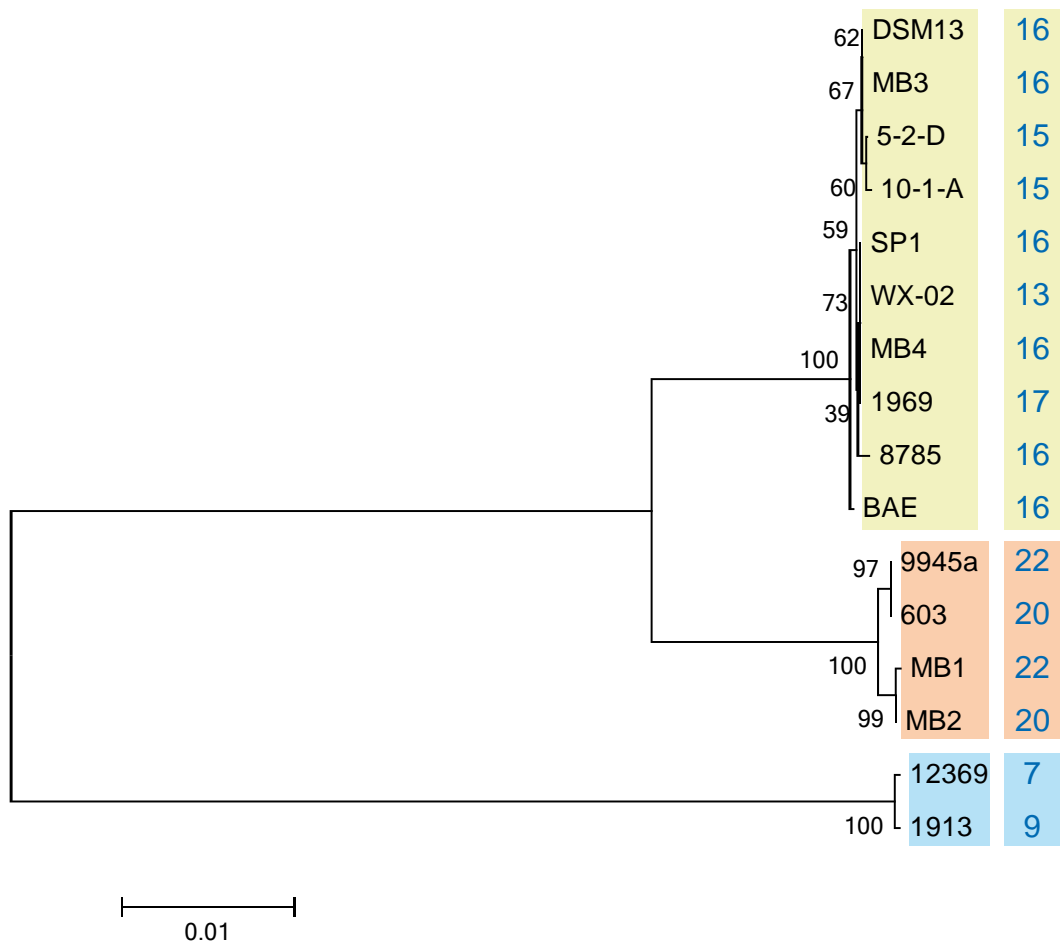


Abbildung 34: Korrelation der BLi_r2291 Kovarianzmodell-Treffer mit der Phylogenie von 16 *B. licheniformis* Stämmen

Der Stammbaum wurde nach Madslie *et al.*, 2012 [146] (siehe Kapitel 2.7.5) erstellt. Die Wahrscheinlichkeit der Knoten wurde mit dem *bootstrap test* (500 Replikate) ermittelt und ist an den Knoten aufgeführt. Die evolutionäre Distanz wurde mit der *Maximum Composite Likelihood* Methode berechnet und bei der Erstellung des Dendrogramms berücksichtigt. Diese ist als Koeffizient (Anzahl der Basenabweichungen bezogen auf die Länge) in der Grafik dargestellt. Bei der Erstellung des Dendrogramms wurden nur 16 von 17 Stämme berücksichtigt, da für *B. licheniformis* 12370 nicht alle nötigen Sequenzen vorlagen. Die drei Subgruppen wurden farblich unterlegt und dahinter die Trefferzahl des BLi_r2291 Kovarianzmodells positioniert (siehe Tabelle 13). Es ist zu erkennen, dass die phylogenetische Aufteilung der 16 betrachteten *B. licheniformis* Stämme mit der Verteilung der BLi_r2291 Kovarianzmodell-Treffer korreliert.

3.4.4 Experimentelle Überprüfung der Promotoraktivität der Kandidaten BLi_r0736 und BLi_r2066

Für die exemplarische experimentelle Kontrolle potentiell neuer *cis*-regulatorischer Elemente wurden BLi_r0736, *cis*-orientiert zu BLi00990, und BLi_r2066, *cis*-orientiert zu BLi2766, ausgewählt. Der Annotation nach handelt es sich bei den potentiellen Regulationszielen um Gene des Format/Nitrat-Stoffwechsels, wobei BLi00990 ein potentieller Format/Nitrat-Transporter ist und BLi02766 eine potentielle Formatdehydrogenase. Die Beobachtung des gemeinsamen Auftretens in anderen Genomen bei der Anwendung der Kovarianzmodelle (Tabelle 14) bestärkt die Annahme, dass die beiden Elemente im selben Stoffwechselweg agieren könnten.

Die Promotorbereiche von BLi00990 und BLi02766 wurden in den Vektor pV3lacZ kloniert und in *B. licheniformis* MW3 übertragen. Die daraus resultierenden Stämme wurden nach Shariat *et al.*, 1995 [109] anaerob mit Glukose und Nitrat angezogen (siehe Kapitel 2.3.4.5) und nach definierten Zeitabständen die Aktivität der β -Galaktosidase ermittelt (siehe Kapitel 2.4.3.1). Als Positivkontrolle wurde eine Promoterfusion des *narGHIIJ* Operons aus *B. licheniformis* DSM13 benutzt, welches für eine Nitratreduktase kodiert und dessen Ortholog in *B. subtilis* 168 unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird [158]. Als Negativkontrolle dienten der Ausgangsstamm der entsprechenden Mutanten und ein Stamm mit dem leeren Ausgangsvektor.

Die β -Galaktosidaseaktivität der beiden Negativkontrollen verblieb auf dem gleichen Grundniveau und nahm im Verlauf des Experiments ab (siehe Abbildung 35). Die Aktivität der Positivkontrolle war nach 2,5 h bei 1000 Miller Units und nach 5 h überschritt sie bereits 1 mio Miller Units. Die Promoterfusion des potentiellen Format/Nitrat-Transporters BLi00990 (*yrhG*) war nicht aktiv. Die beobachtete β -Galaktosidaseaktivität in diesem Stamm entsprach in etwa den beiden Negativkontrollen. Im Fall der Promoterfusion von BLi02766 (*yrhE*), einer potentiellen Formatdehydrogenase, ist eine Zunahme der β -Galaktosidaseaktivität beobachtet worden. Diese wies im Verlauf des Experiments eine ansteigende Tendenz auf und war deutlich über dem Niveau der beiden Negativkontrollen.

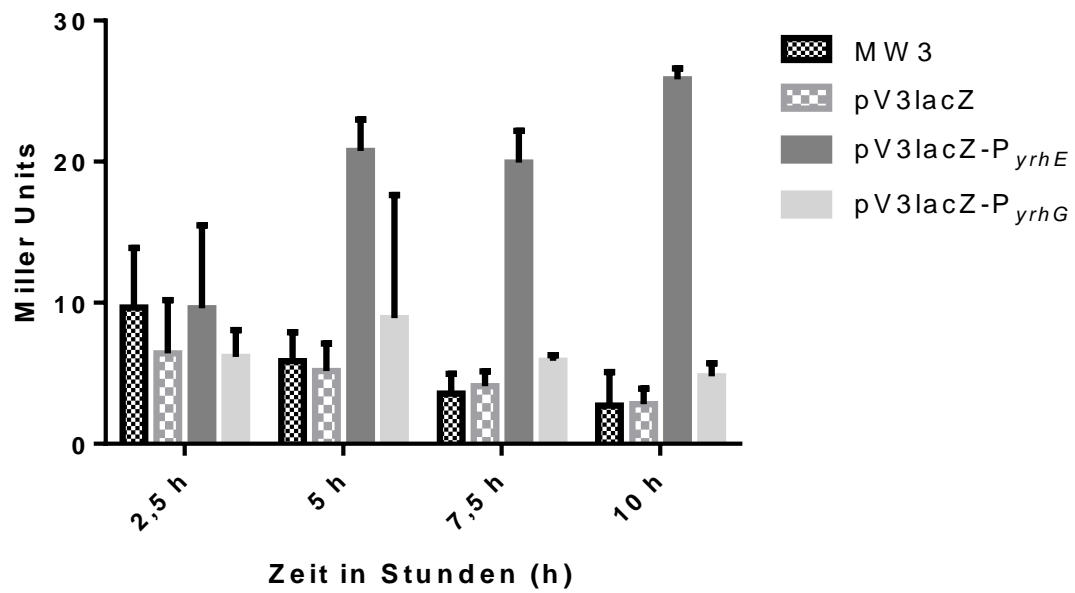


Abbildung 35: Promotoraktivität von *yrhG* und *yrhE* unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat

Alle verwendeten Stämme basieren auf *B. licheniformis* MW3. Die Balken der beiden Negativkontrollen sind gemustert. Die Balken der beiden Promoterfusionen sind gefüllt. Die Ergebnisse der Positivkontrolle, einer Promotofusion des *narGHJ* Promotors, sind in der Abbildung nicht dargestellt. Diese erreichten eine β -Galaktosidaseaktivität von über 500 Miller Units nach 2,5 h, über 1000 Miller Units nach 5 h und über 1 Million nach 7,5 h und 10 h. Die Promotorfusion von *yrhE* zeigt im Verlauf des Experiments eine Zunahme der β -Galaktosidaseaktivität. Diese überschreitet nach 10 Stunden das Vierfache der Grundaktivität der Negativkontrollen. Die β -Galaktosidaseaktivität der *yrhG*-Promoterfusion entspricht der Aktivität der beiden Negativkontrollen. Die zugrundeliegenden Messwerte sind in Tabelle 21 im Anhang aufgeführt.

4 Diskussion

4.1 Prophagen in *B. licheniformis* DSM13

Die Grundlage für die vorliegende Dissertationsarbeit waren Transkriptomsequenzierungen, einer industriellen Subtilisin-Fermentation mit einem Derivat von *B. licheniformis* DSM13 [94]. Der erste Schritt der Auswertung schuf gleichzeitig die Grundlage für tiefergehende Analysen, des durch die Transkriptomsequenzierung geschaffenen "Datenbergs". Dieser bestand in der Aktualisierung der bereits etwa 10 Jahre alten *B. licheniformis* DSM13 Genomannotation [35, 36]. Im Zusammenhang mit der Reannotation ist ein Schwerpunkt auf Prophagen gelegt worden [94]. Auch wenn mit dem Prophagen-Projekt der Fokus vom grundsätzlichen Vorhaben abwich, so war es mit dem übergeordneten Ziel, einer Beleuchtung des Organismus *B. licheniformis* aus dem industriellen Blickwinkel (GenoMik Industrie), konform. Prophagen können bei industriellen Produktionsprozessen durchaus problematisch sein [45, 46] und eine verbesserte Möglichkeit diese Risiko einzuschätzen ist interessant. Mit dem Wissen über die genetische Information und Lokalisation der Prophagen, eröffnen sich Möglichkeiten der gezielten Manipulation. So könnten Stämme, ohne aktive Prophagen, geschaffen werden, und das wiederum Industrieprozesse berechenbarer machen. Die gezielte Entfernung aktiver Prophagenbereiche wäre ressourcenschonender und schneller als die Beseitigung des gesamten Prophagenpotentials eines Stamms. Wie dabei vorgegangen werden kann, ist am Beispiel von *B. licheniformis* Δ PBSX- Δ BLi_Pp3 demonstriert worden. Vom praktischen Aspekt abgesehen, ist auch aus rein wissenschaftlicher Sicht, die gesteigerte Genauigkeit, bei der Identifizierung aktiver Prophagen, von Bedeutung. Sie erlaubt in Zukunft eine noch detailreichere Beschreibung bakterieller Genome.

4.1.1 Sieben Prophagen im Genom von *B. licheniformis* DSM13

Bei der Untersuchung des Genoms von *B. licheniformis* DSM13 konnten sieben Prophagenbereiche identifiziert werden. Die Prophagen weichen abgesehen von BLi_Pp2 in ihrem GC-Gehalt vom Wirts-GC-Gehalt ab und konnten mittels Integrationssequenzen eingegrenzt werden. Neben diesen allgemein angewandten Kriterien gab es bei Prophagen BLi_Pp1 und BLi_Pp7 weitere Hinweise, die für

einen Prophagen sprachen. BLi_Pp1 ist neben einem tRNA-Cluster lokalisiert. Eine Assoziation von Prophagen mit tRNA-Genen ist in der Literatur erwähnt [168, 169]. Bei Prophagen BLi_Pp7 wurde als zusätzlicher Hinweis das im Prophagenom identifizierte Restriktions-Modifikations-System (RM-System) [39] gewertet. RM-Systeme sind ebenfalls als Bestandteile von Prophagen in der Literatur beschrieben [170, 171].

Durch den Abgleich der Prophagenproteine aus *B. licheniformis* DSM13 mit den Proteinen bekannter Phagen, konnten diese der Ordnung *Caudovirales* zugeordnet werden. Diese Ordnung beherbergt die Familien *Myoviridae*, *Siphoviridae* und *Podoviridae*. Eine tiefergehende Einordnung war nicht möglich. Das lag an der teilweise unvollständigen Klassifizierung, der für die Datenbank verwendeten Phagen Genome (siehe Tabelle 17) und vermutlich auch an der relativ kleinen Datenbank, in Anbetracht der möglichen Phagenvielfalt [55]. Weiterhin macht der Mosaikcharakter von Prophagen Genomen [172] es sehr schwer auf Grundlage der angewandten Herangehensweise eindeutige Einordnungen zu machen. Zum Beispiel hatten 54% der Prophagenproteine vom BLi_Pp6 Homologien zu dem *lambda-like Bacillus*-Phagen phi105, wobei 26% davon eine Top-Homologie aufwiesen. Alle weiteren BLi_Pp6-Prophagenproteine zeigten hingegen keinerlei Ähnlichkeit zu Proteinen dieses Phagentyps (siehe Tabelle 17).

Prophagen der Ordnung *Caudovirales* kodieren ihr Genom in dsDNA [173]. Diese Information war für die weitere Auswertung wichtig, da die zur Untersuchung der Prophagenaktivität eingesetzte Sequenziermethode auf dsDNA ausgerichtet war (siehe Kapitel 3.1.7).

Auf Grundlage ihrer Annotation, Größe und transkriptionellen Expression könnten die sieben identifizierten Phagen Genome in Prophagen (BLi_Pp2, BLi_Pp3, BLi_Pp4 und BLi_Pp6) und rudimentäre Prophagen (BLi_Pp1, BLi_Pp5 und BLi_Pp7) aufgeteilt werden. BLi_Pp1 und BLi_Pp5 sind mit ihrer Genomgröße von etwa 11 kb in Bezug zu den in der Literatur beschriebenen *Siphoviridae* [174] und *Myoviridae* [175] zu klein um ein vollständiges Genom darzustellen. BLi_Pp7 könnte zwar eine ausreichende Größe haben, hier konnten aber keine Phagenschlüsselproteine [53] nachgewiesen werden (siehe Tabelle 17 im Anhang). Außerdem stärkt die Beobachtung, dass Gene der rudimentären Prophagen beim Wachstum ohne Mitomycin C stark exprimiert sind [176], die Vermutung, dass es sich hierbei bereits um für den Wirt vorteilhafte und

ungefährliche Überbleibsel handelt, wie von Lawrence *et al.*, 2001 [44] beschrieben. Dass Gene aus den potentiell rudimentären Prophagenregionen für *B. licheniformis* DSM13 nützlich sein können, ist anhand des RM-Systems in BLi_Pp7 experimentell belegt [39], das vom Wirt als eine Art Immunsystem gegen eindringende DNA verwendet wird. Das Transkriptionsprofil der möglichen Prophagenregionen zeigt im gleichen Experiment nur wenige aktive Gene, von denen mindestens eins laut Annotation ein Transkriptionsregulator ist. Das spricht für die aktive Repression dieser Prophagen und somit für ihre Vollständigkeit.

4.1.2 Partikelbildende Prophagen

Um herauszufinden, ob die identifizierten Prophagenregionen auch Phagenpartikel generieren können, wurden Induktionsexperimente mit Mitomycin C durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.4), die gewonnenen Phagensuspensionen mikroskopiert (siehe Kapitel 3.1.5), die DNA aus den Phagenpartikeln untersucht (siehe Kapitel 3.1.6), NGS sequenziert und die Phagen-DNA-Sequenzen auf das Genom von *B. licheniformis* DSM13 kartiert (siehe Kapitel 3.1.7). Um die einzelnen Sequenzierexperimente miteinander vergleichen zu können, wurden normalisierte Aktivitätswerte (NPKM-Werte) berechnet und graphisch dargestellt (siehe Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11).

Phagen-DNA-Sequenzen, gewonnen aus Phagenpräparationen von *B. licheniformis* DSM13 / MW3, zeigten eine recht gleichmäßige Verteilung der Sequenzen auf dem Chromosom von *B. licheniformis* DSM13. Die Sequenzanhäufungen am linken und rechten Rand der grafischen Darstellung (siehe Abbildung 9) können mit dem an dieser Stelle liegende Replikationsursprung und damit erhöhten DNA-Menge erklärt werden [177]. Da die Replikationsgabel in beide Richtungen läuft, und für die lineare Darstellung das Genom am Replikationsursprung aufgemacht wurde, sind beide Ränder betroffen.

Die starke Sequenzakkumulation an der Prophagenregion BLi_Pp3 wurde an dieser Stelle bereits als Hinweis für den Ursprung der zweiten Phagen-DNA Bande gewertet. Weiterhin zeigten auch Regionen wie BLi_Pp2, BLi_Pp6, BLi_Pp7 sowie eine genomische Region um 3,8 Mbp Sequenzakkumulationen,

wobei aufgrund des vorliegenden starken Hintergrunds chromosomaler Sequenzen zu diesem Zeitpunkt keine nähere Aussage dazu möglich war.

Die beobachteten Einbrüche in den NPKM-Werten sind auf die Art der Sequenzkartierung zurückzuführen. Hier wurden nur Sequenzen berücksichtigt, die im Genom ein einziges Mal zugeordnet werden konnten. Somit blieben wiederholend auftretende Sequenzbereiche frei von kartierten Sequenzen und erzeugten somit Lücken in den NPKM-Werten. Ein weiterer Grund für Lücken in der Abdeckung waren Deletionsbereiche in den verwendeten Mutanten. Das war bei der Phagen-DNA aus *B. licheniformis* MW3, bei dem das RM-System im Prophagen BLi_Pp7 deletiert ist, der Fall. Hier sieht man im Vergleich zu *B. licheniformis* DSM13 einen Abfall der NPKM-Werte im Bereich von BLi_Pp7 (siehe Abbildung 9). Abgesehen von der beschriebenen Abweichung verhielten sich *B. licheniformis* DSM13 und MW3 in allen Experimenten gleich, was wichtig ist festzustellen, da alle verwendeten Prophagenmutanten auf dem genetisch leichter zugänglichen *B. licheniformis* MW3 basierten.

An dieser Stelle war klar, dass einer von den partikelbildenden Prophagen willkürlich Wirts-DNA einpackt. In Anbetracht des PBSX-ähnlichen Prophagenpartikels (siehe Abbildung 7 A) und der auf genomischer Ebene hohen Ähnlichkeit von BLi_Pp2 zum PBSX-Prophagen aus *B. subtilis* 168 (siehe Kapitel 3.1.1) lag die Vermutung nahe, dass BLi_Pp2 chromosomale DNA transportiert. Aus diesem Grund wurde für das nächste Sequenzierexperiment der BLi_Pp2-defiziente *B. licheniformis* Δ PBSX-Stamm verwendet. Bei der Auswertung der aus diesem Stamm gewonnenen PhagenDNA-Sequenzen konnte festgestellt werden, dass die zuvor beobachtete Kontamination mit chromosomaler DNA verschwunden war. Jetzt konnten eindeutige Sequenzakkumulationen über Prophagenbereichen beobachtet werden. Dabei war überraschend, dass die Phagen-DNA im Agarosegel nur eine Bande aufwies (siehe Abbildung 8), bei der Sequenzzuordnung aber zwei Sequenzanhäufungen beobachtet wurden (siehe Abbildung 10). Es handelte sich um BLi_Pp3 und BLi_Pp6. Prophagenregion BLi_Pp3 wies die stärkere Sequenzakkumulation auf, wobei diese am rechten Rand über einen Bereich von 200 kb langsam abfiel und den Prophagen BLi_Pp4 abdeckte. Die zweite beobachtete Sequenzakkumulation am BLi_Pp6 war geringer als am BLi_Pp3 und an den Rändern klar abgegrenzt. Um zu klären, ob BLi_Pp4 zu der beobachteten Sequenzakkumulation am

B_{Li}_Pp3 beiträgt und um zu klären, welchem Prophagen die im Agarosegel beobachtete ~40 kb DNA Bande zugeordnet werden kann (siehe Abbildung 8), wurde der B_{Li}_Pp3-defiziente Stamm *B. licheniformis* ΔPBSX-ΔB_{Li}_Pp3 hergestellt. Bei der Untersuchung dieses Stammes war sowohl im Induktionsexperiment (siehe Kapitel 3.1.4) und bei der Untersuchung der Phagenpartikel mittels TEM (siehe Kapitel 3.1.5), als auch der Phagen-DNA im Agarosegel (siehe Kapitel 3.1.6) keinerlei Hinweis auf das Vorliegen eines weiteren aktiven Prophagen zu beobachten. Erst die NGS-Sequenzierung der Phagen-DNA offenbarte die Aktivität des B_{Li}_Pp6-Prophagen (siehe Kapitel 3.1.7.3). Ausschließlich diese Prophagenregion wies eine Akkumulation von Phagen-DNA-Sequenzen auf. Da die Präparationsmethode der Phagen-DNA darauf beruht nur partikelgeschützte Phagen-DNA aufzureinigen, muss der B_{Li}_Pp6-Phage fähig sein, solche zu generieren. Anscheinend reicht die Wurfgröße dieses Prophages unter den angewandten Bedingungen nicht aus, um seine Aktivität mit den klassischen Methoden nachzuweisen. An diesem Beispiel wird die ergänzende Bedeutung der NGS-Technologie für die Untersuchung von Prophagen deutlich. Denn trotz der bereits vorgenommenen Untersuchung von *B. licheniformis* DSM13 im Hinblick auf seine Prophagen [52], ist es erst mittels NGS gelungen, einen dritten aktiven Prophagen zu identifizieren. Außerdem war mit dieser Methode erstmals eine Zuordnung der aktiven Phagen zu den kodierenden Sequenzbereichen im Genom von *B. licheniformis* DSM13 möglich. Die Prophagenregion B_{Li}_Pp4 zeigte im Rahmen der Phagen-DNA-Sequenzierung aus dem Stamm *B. licheniformis* ΔPBSX-ΔB_{Li}_Pp3 keine Sequenzakkumulationen. Daraus wurde geschlossen, dass B_{Li}_Pp4, zumindest unter den hier angewandten Bedingungen, keine DNA-tragenden Phagenpartikel ausbildet.

4.1.3 Der PBSX-ähnliche Prophage B_{Li}_Pp2

Der Prophage B_{Li}_Pp2 wies weder Integrationssequenzen noch eine Abweichung im GC-Gehalt in Bezug zum Wirtsgenom auf. Seine Identifizierung beruhte auf der hohen Ähnlichkeit seiner Proteine zum PBSX-Prophagen des *B. subtilis* 168 [157], seiner Morphologie und seiner Fähigkeit ~13 kb Wirts-DNA-Fragmente zu verpacken. Die Abwesenheit der Integrationssequenzen und die fehlende Schwankung des GC-Gehaltes deuten auf eine sehr frühe Integration dieses Prophagen hin. Da dieser in vielen Mitgliedern der Subtilis-Gruppe zu finden ist,

scheint sich der Prophage bereits im gemeinsamen Vorfahren dieser Gruppe etabliert zu haben, so dass dieser als gemeinsames Erbe in Stämmen dieser Gruppe zu finden ist [52]. Doch stellt sich die Frage, warum ein Prophage, bei dem durch den Wirt die prophagenspezifischen genomischen Kontraste bis zur Unkenntlichkeit verwischt sind, immer noch relativ vollständige Phagenpartikel generieren kann? Diese Eigenschaft kann unter bestimmten Bedingungen den Wirt das Leben kosten, ist somit für den Wirt gefährlich und im Widerspruch mit der von Lawrence *et al.*, 2001 [44] aufgestellten These. Laut dieser degradiert der bakterielle Wirt die für ihn gefährlichen Bereiche eines Prophagen im Laufe der Zeit und behält nur die für ihn ungefährlichen und vorteilhaften Komponenten.

Dieser Widerspruch könnte sich auflösen, wenn man annimmt, dass die Gefahr lysiert zu werden geringer wiegt, als der Vorteil, den dieser Prophage mitbringt. Dass der PBSX-ähnliche Prophage mit der Fähigkeit Phagenpartikel zu bilden einen Vorteil haben muss, liegt in Anbetracht seiner Konservierung in der Subtilis Gruppe nahe [52].

Um diese Vorteile zu erfassen muss man seine Eigenschaften genauer betrachten.

- I. Dieser Prophage wird vom Wirt im geringen Masse natürlicherweise freigesetzt [178] oder durch Einwirkung von Antibiotika [179] und anderen chemischen Agenzien stark induziert [180].
- II. Ein Hauptmerkmal der PBSX-ähnlichen Prophagen ist die Fähigkeit chromosomale Wirts-DNA zu verpacken [49, 157, 181]. Diese wird nicht in ein anderes Bakterium injiziert [179], was auch für BLi_Pp2 bei *B. licheniformis* DSM13 experimentell belegt wurde [182].
- III. Dafür können die Phagenpartikel der PBSX-ähnlichen Phagen nah verwandte Stämme ihres Wirts lysieren [49, 178, 179].

Bedenkt man, dass verschiedene *Bacillus* Stämme in ihrer natürlichen Umwelt gemeinsam vorkommen und durchaus miteinander um Ressourcen konkurrieren können [183], so erkennt man, dass die oben beschriebenen Eigenschaften des PBSX-Prophagen ein Vorteil für seinen Wirt sein können. So können am Rand der Wirtspopulation mit Antibiotika angegriffene Zellen PBSX-Partikel freisetzen, die Konkurrenz abtöten und somit der Wirtspopulation nutzen. Darüber hinaus wird das Wirtsgenom, der lysierten Zellen über ihren Tod hinaus gerettet und beim Zerfall des Phagen wieder frei gesetzt. In Anbetracht der *Bacillus*-Fähigkeit zur genetischen Kompetenz, bei der freie DNA aus der Umwelt

aufgenommen werden kann, um das eigene genetische Material zu reparieren oder zu ergänzen [38], bekommt dieser Prophage eine weitere vorteilhafte Rolle für seinen Wirt. Somit schützt der PBSX-Prophage seine Wirtspopulation vor Konkurrenz und hält ihr kompatibles genetisches Material bereit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf einen weiteren Vorteil hin, den der PBSX-ähnliche Prophage seinem Wirt verschafft. Betrachtet man die Induktionsexperimente im Kapitel 3.1.4, so wird deutlich, dass der Stamm *B. licheniformis* DSM13, welcher den PBSX-ähnlichen Prophagen beherbergt, 3 h nach der Induktion mit Mitomycin C eine Trübungsabnahme aufwies und somit am schnellsten einen Lysiseffekt zeigte. Der Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX zeigte erst nach 6 h eine Trübungsabnahme. Die Untersuchung der Phagenpartikel (siehe Kapitel 3.1.5) sowie der Phagen-DNA (siehe Kapitel 3.1.6) zeigten, dass die aus *B. licheniformis* DSM13 freigesetzten Phagenpartikel hauptsächlich aus dem PBSX-ähnlichen Prophagen bestehen. Die Sequenzierdaten der Phagen-DNA waren im Einklang mit den vorrangenden Beobachtungen. Erst die Beseitigung des PBSX-ähnlichen Prophagen, im Stamm *B. licheniformis* Δ PBSX ermöglichte die Beobachtung eines neuen Phagenpartikels (siehe Abbildung 7 B), einer zweiten Phagen-DNA-Bande (siehe Abbildung 8) und mittels Sequenzierung sogar die Identifizierung eines bis dahin völlig unbemerkten dritten aktiven Prophagen (siehe Kapitel 3.1.7.3). Damit hat der PBSX-ähnliche Prophagen BLi_Pp2 durch seine sehr schnelle Fertigungszeit und seine sehr hohe Wurfgröße die Untersuchung weiterer, im Genom befindlicher Prophagen, erschwert, beziehungsweise unmöglich gemacht. Doch was ein Hindernis für diese Untersuchung war, kann als potentieller Vorteil im natürlichen Habitat angesehen werden. So kann der PBSX-ähnliche Prophage unter induzierenden Bedingungen mit seiner Geschwindigkeit andere, im Genom des Wirts sitzende Prophagen, „ausstechen“ und einen Schaden zu einem Vorteil wenden.

4.2 Vektoren zur Verwendung in *B. licheniformis*

Die in dieser Arbeit erstellten Vektoren sind für die Verwendung in *B. licheniformis* hergestellt worden. Der Transfer des Vektors von *E. coli* auf *Bacillus* mittels Konjugation macht eine direkte Übertragung auf Wildtyp-Stämme möglich. Somit ist für den Gebrauch dieses Vektorsystems kein Arbeitsstamm wie *B. licheniformis* MW3 [39] erforderlich oder die Induktion einer artifiziellen genetischen Kompetenz, wie das bei einem integrativen System der Fall wäre [40, 64].

4.2.1 pV2 Shuttle-Vektor-System

Das in dieser Arbeit hergestellte pV2 Shuttle-Vektor-System kann in *E. coli* und *Bacillus* erfolgreich replizieren. Der Replikations-*Origen* für *E. coli* stammt aus dem pSG1151-Vektor und ist äquivalent zum bekannten pUC19-Vektor-*Origen* [184], was eine sichere Replikation in *E. coli* garantiert.

Der in pV2 verwendete Replikations-*Origen* für *Bacillus* stammte aus dem Plasmid pUB110, welches ursprünglich aus *Staphylococcus aureus* isoliert wurde und mit etwa 50 Kopien repliziert. Die Anwendung von pUB110 in *B. subtilis*, *B. licheniformis* und *B. pumilus* zeigt, dass der Vektor in verschiedenen Spezies einsetzbar ist [104]. Darüber hinaus ist die erfolgreiche Replikation von pUB110 in *Clostridium acetobutylicum* nachgewiesen [185]. Aus diesem Grund sollte der pUB110 *Origin* pV2 und seinen Derivaten ermöglichen in den erwähnten Stämmen, und eventuell in weiteren Mitgliedern der *Firmicutes*, zu replizieren. In Kombination mit der RP4-Konjugationsmaschinerie, könnte der Einsatzbereich von pV2 und seiner Derivate erheblich erweitert werden. Tabelle 15 zeigt ein Spektrum an Organismen, in welche mittels des RP4-Konjugationssystems erfolgreiche DNA übertragen wurde.

Tabelle 15: Rezipientenspektrum des RP4-Konjugationssystems

Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	Art	Plasmid	Ref.	
<i>Cyano bacteri a</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Nostocaceae</i>	<i>Anabaena</i>		pRL1,- 5,-6 (9,26 kb, 11,1 kb,1 1,3 kb)	[186]	
		<i>Cyanophyceae</i>	<i>Anacystis</i>		pSG111 derivat	[186]	
<i>Bacter oidetes</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	pDP1 (19 kb)	[187]	
<i>Clostri dia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>botulinum</i>	pJIR145 7 (6,2 kb)	[188]	
			<i>Clostridium</i>	<i>sordellii</i>		[189]	
			<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	pJIR145 6 (6,8 kb)	[190]	
<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	pAT187 (10,4 kb)	[191]	
		<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	pAT187 (10,4 kb)	[191]	
	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i>	pAT187 (10,4 kb)	[191]	
				<i>licheniformis</i>	pKVM1- 3 (9,1- 10,3 kb)	[66]	
			<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	pAT187 (10,4 kb)	[191]
			<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	pAT187 (10,4 kb)	[191]
<i>Actino bacteri a</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>lividans</i>	pPM801 (14,4 kb) pPM803 (10,5 kb)	[192]	
		<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynoforme</i>	Gruppe A, B, C (nicht Gruppe D)	pECM1	[193]	

Der modulare Aufbau des pV2-Vektors erlaubt es einzelne Elemente auszutauschen und somit das Vektorsystem an die Bedürfnisse des jeweiligen Experiments anzupassen. So ist es möglich, den Replikations-*Origen* für *E. coli*, für *Bacillus* oder die Kanamycin-Resistenz separat auszutauschen. Das vollständige Beseitigen der pUB110-Replikationskassette ermöglicht auch den Einsatz als Suizidvektor. Mit einer Größe von 4,4 kb ist pV2 einer der kleinsten konjugativen *Shuttle*-Vektoren (siehe Tabelle 15), was eine gute Grundlage für den zweckgebundenen Ausbau darstellt.

4.2.2 Reporterplasmide auf der Grundlage von pV2

Die erstellten Reporterplasmide sind in der Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Erstellte Reporterplasmide

Plasmid	Reportergen	Bemerkung
pV3DSLacZ	<i>lacZ</i>	mit artifizieller RBS
pV3lacZ	<i>lacZ</i>	ohne artifizieller RBS
pV3Xg	P_{xyLAB} <i>gfp</i>	Xylose induzierbar
pV3g	<i>gfp</i>	nicht Xylose induzierbar
pV3Xb	P_{xyLAB} <i>bgaB</i>	Xylose induzierbar, einsetzbar über 37 °C
pV3b	<i>bgaB</i>	nicht Xylose induzierbar, einsetzbar über 37 °C

Durch das Übertragen der Reporter-kassette aus pAC6 und pAC7 auf pV2, wurden die Vektoren pV3DSLacZ (pAC6) und pV3lacZ (pAC7) generiert (siehe Kapitel 3.2.2). Diese können für Promotoranalysen eingesetzt werden. Das β -Galaktosidase-basierte System kann unter einfachen Laborbedingungen schnell und mit hoher Probendichte umgesetzt werden. Da die Reporter-kassetten aus etablierten *B. subtilis* Vektoren stammen, konnten auch die Arbeitsprotokolle übernommen werden. Die erhobenen Daten sind ein Querschnitt über die Population und quantitativer Natur. Das System konnte in *B. licheniformis* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen erfolgreich eingesetzt werden (siehe Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2).

Im Fall von pV3Xg und pV3g handelt es sich um ein GFP-basiertes Reportersystem. Das *gfp*-Gen stammte ursprünglich aus der Qualle *Aequoria victoria* und ist sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten aktiv [194]. Im Gegensatz zu einem β -Galaktosidase-basierten System kann die GFP-Aktivität *in vivo* unter einem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden [195]. Mittels GFP-Fusion sind auch Proteinlokalisationsuntersuchungen möglich [196]. Die GFP-Fluoreszenz kann mittels eines Microtiterplattenfluorometers oder eines *Real-time thermal Cyclers in vivo* oder im Extrakt quantifiziert werden [197].

Der pV3Xg-Vektor hat einen Xylose-induzierbaren Promotor aus *B. megaterium*. Dadurch lässt sich ein *cis*-RNA-Regulator-*gfp*-Konstrukt mit D-Xylose induzieren. So kann die Untersuchung eines *Riboswitches*, unabhängig von seinem nativen Promotor ermöglicht werden. Am Beispiel des *pbuG-Riboswitches* (siehe Kapitel 3.2.3.1) war es möglich das Konzept und die Funktionalität des Vektors erfolgreich zu überprüfen. Unabhängig von seiner Funktion als Reporterkonstrukt kann der pV3Xg auch als Expressionsvektor benutzt werden. Hierfür muss das *gfp* gegen das gewünschte Gen ausgetauscht werden.

Der pV3g-Vektor hat im Gegensatz zu pV3Xg keinen induzierbaren Promotor. Damit ist dieses System ähnlich dem pV3SDlacZ / pV3lacZ und kann auch für ähnliche Fragestellungen eingesetzt werden. Der pV3g Vektor konnte im Rahmen der Dissertation nicht getestet werden. Da die Konzeption von pV3g auf pV3Xg basiert und deren Funktion experimentell belegt wurde (siehe Kapitel 3.2.3.1), wird von der Funktion des pV3g ausgegangen. Beide Vektoren pV3Xg als auch pV3g haben keine Ribosomenbindestelle vor ihrem Reporter gen lokalisiert. Sollte ausschließlich die transkriptionelle Aktivität eines Promotors mit diesem Reportersystem betrachtet werden, so müsste eine artifizielle Ribosomenbindestelle mittels Oligonukleotidüberhängen im Rahmen der Klonierung integriert werden.

Die Vektoren pV3Xb und pV3b sind homolog zu pV3Xg und pV3g mit dem Unterschied, dass anstatt *gfp* das β -Galaktosidase-Gen *bgaB* aus *Geobacillus stearothermophilus* [162] als Reporter eingesetzt wurde. Das *bgaB*-Gen wurde bereits in anderen Systemen erfolgreich als Reporter gen eingesetzt [198]. Die Motivation dieses Reporter gen zu verwenden, war die höhere Thermostabilität im Vergleich zum *lacZ* aus *E. coli*. Im Rahmen der Dissertation konnten beide *bgaB* Konstrukte nicht auf ihre Funktion in *B. licheniformis* getestet werden.

Allgemein lässt sich sagen, dass mit dem hier vorgestellten Vektorsystem ein neues genetisches Werkzeug für die Arbeit mit *B. licheniformis* geschaffen wurde. Dieses ist modular aufgebaut und lässt sich an unterschiedliche Fragestellungen anpassen. Darüber hinaus verspricht es Potential für den Einsatz in nah verwandten Organismen.

4.3 *Antisense*-RNA AprAs

Das Transkriptionsprofil des *apr* Gens in *B. licheniformis* DSM13 offenbarte am 3' Ende des kodierenden Bereichs, die Existenz einer *antisense*-sRNA (AprAs). Die Abschaltung der *aprAs*-Transkription offenbarte die reprimierende Natur dieses Element in Bezug auf die Exoproteaseaktivität (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.3).

4.3.1 Exoprotease-Phänotyp der AprAs⁻ Mutante

Das *aprAs*-Gen liegt vollständig auf dem Gegenstrang des kodierenden Bereichs des *apr* Gens (siehe Abbildung 24). Aus diesem Grund ist die Untersuchung dieser sRNA mittels Mutationen eine Herausforderung gewesen. Es schien wahrscheinlich, dass AprAs regulatorisch auf die *apr* mRNA wirkt (siehe Kapitel 4.3.3), was eine direkte Deletion von *aprAs* ausschloss. Hierbei wäre auch das *apr*-Gen beschädigt worden und eine Aussage zum regulatorischen Potential von AprAs nicht möglich gewesen. Daher war die Inaktivierung der *aprAs*-Transkription eine Alternative um einen AprAs-defizienten Stamm zu erzeugen. Anhand der experimentell ermittelten TSS konnte eine potentielle -10-Region eines Sigma A-Promotors identifiziert werden (siehe Abbildung 25). Diese lag außerhalb des kodierenden Bereichs von *apr*. Für die Erstellung der AprAs defizienten Mutante wurde die identifizierte -10-Promotorregion gegen die GC-reiche Erkennungssequenz der *AscI*-Endonuklease ersetzt. Die Verwendung der *AscI*-Erkennungssequenz ermöglichte später eine einfache und schnelle Überprüfung dieses Stamms (siehe Abbildung 26). Der Austausch der AT-reichen -10-Promotorregion gegen eine GC-reiche Sequenz unterband wie erhofft die Expression von *aprAs*, was mittels eines *Northern Blots* nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.3.1). In diesem Experiment wurde *B. licheniformis* MW3 und MW3 AprAs⁻ in vier verschiedenen Medien angezogen und deren Gesamt-RNA in der exponentiellen Phase untersucht. Hierbei konnte in allen Medien die Anwesenheit von AprAs in *B. licheniformis* MW3 und die Abwesenheit von AprAs in MW3 AprAs⁻ nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27). Dabei ist aufgefallen, dass die Signale für AprAs sich in der Stärke von Medium zu Medium unterschieden (siehe Abbildung 27 B). Das könnte ein Hinweis auf eine mögliche Regulation von *aprAs* sein, die durch die unterschiedliche Expression in den verschiedenen Medien deutlich wird, oder auf die nicht homogene Qualität,

der in dieser Untersuchung eingesetzten Gesamt-RNA, zurückzuführen sein (siehe Abbildung 27 A).

Die AprAs-defiziente Mutante zeigte im Vergleich zum Ausgangsstamm, eine qualitative Erhöhung der Exoproteaseaktivität auf M9-Platten supplementiert mit Milchpulver (siehe Abbildung 28). Diese Beobachtung konnte mittels einer Exoproteasemessung quantitativ verifiziert werden (siehe Abbildung 29), wobei deutlich wurde, dass *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ unter den verwendeten Bedingungen etwa vier Mal mehr Exoproteaseaktivität aufwies als der zugrundeliegende Stamm. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis, dass das *apr*-Gen, welches für eine Exoprotease kodiert, das regulatorische Ziel von AprAs ist, da die AprAs-defiziente Mutante eindeutig einen abweichenden Exoproteasephänotyp zeigt.

4.3.2 Komplementation der AprAs⁻ Mutante

Die AprAs-defiziente Mutante *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ zeigt einen eindeutigen Exoproteasephänotyp (siehe Kapitel 3.3.2). Zur Erstellung dieser Mutante wurde die -10-Promotorregion des *aprAs*-Gens gegen eine GC-reiche Sequenz ausgetauscht (siehe Kapitel 3.3.1). Auch wenn sich dieser Sequenzaustausch nicht im kodierenden Bereich des auf dem Gegenstrang lokalisierten *apr*-Gens befand, so betraf die erwähnte Manipulation trotzdem die *apr*-mRNA (siehe Abbildung 25), da sie zwischen dem *apr*-Stopcodon und dem *apr*-Terminator eingefügt wurde. Um sicherzustellen, dass der beobachtete Exoproteasephänotyp von *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ auf die Abwesenheit von AprAs und nicht auf die Manipulation der *apr*-mRNA zurückzuführen ist, wurde der AprAs-defiziente Stamm komplementiert. Hierfür wurde der im Rahmen dieser Arbeit erstellte konjugative *Shuttle*-Vektor pV2 verwendet, in den das Gen *aprAs* kloniert wurde.

Die Untersuchung der komplementierten Stämme mittels *Northern Blot* zeigte, dass AprAs erfolgreich vom pV2*aprAs*-Vektor exprimiert werden konnte. Alle Stämme, die *aprAs* entweder im Chromosom oder auf dem Plasmid trugen, gaben unter Verwendung einer spezifischen Sonde gegen AprAs ein Signal (siehe Abbildung 30). Die Untersuchung der Exoproteaseaktivität zeigte, dass die AprAs-defiziente Mutante, komplementiert mit einem *aprAs*-Gen auf dem pV2-Vektor (*B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ pV2*aprAs*), wieder den Wildtyp-Phänotyp aufweist. Damit wurde nachgewiesen, dass der beobachtete Exoproteasephänotyp

auf die Abwesenheit von AprAs zurückzuführen ist und nicht auf die Modifikation der *apr*-mRNA. Die repressive Natur von AprAs wurde vor allem am Stamm *B. licheniformis* MW3 pV2*aprAs* deutlich. Hier gab es neben der chromosomalen Kopie vom *aprAs* weitere Instanzen auf dem pV2*aprAs*-Vektor und die gemessene Exoproteaseaktivität war unter die des zugrundeliegenden Stamms gefallen.

Für die Wiederherstellung des Phänotyps von *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ wurde ein Vektor-basiertes System (in *trans*) mit etwa 50 Instanzen verwendet (siehe Kapitel 4.2.1) und damit die AprAs sRNA stark überexprimiert (siehe Abbildung 30). Damit konnte man den Effekt kompensieren, der durch das Fehlen einer chromosomalen Instanz ausgelöst wurde. Dieser Zusammenhang offenbart, dass die Lokalisation von *aprAs* für das volle regulatorische Potential wichtig ist und ist damit ein weiterer Hinweis, dass *apr* das regulatorische Ziel der AprAs sRNA ist.

Neben den bereits besprochenen Ergebnissen, gab es eine weitere Beobachtung im *Northern Blot* der Komplementationsstämme (siehe Abbildung 30). Hier kann man neben der grundsätzlichen Signalanwesenheit bei Komplementation, ein Dreifachsignal beobachten. Da das Dreifachsignal in *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ mit Leervektor nicht vorliegt, wir davon ausgegangen, dass es nicht mit dem verwendeten Vektorsystem zusammen hängt. Da es nicht oder nur minimal beim Nachweis von AprAs im Agarosegel beobachtet wurde (siehe Abbildung 27), wird davon ausgegangen, dass es sich um ein Artefakt handelt, dass aufgrund der Verwendung des Polyacrylamid-Gelsystems (siehe Kapitel 2.4.5.2), oder der Verwendung von M9-Medium mit Milchpulver, aufgetreten ist.

4.3.3 *apr* und *aprAs*

Das Gen BLi_r0872, benannt als *aprAs*, ist eine *antisense*-RNA des *apr* Gens (siehe Kapitel 3.3.1). Sowohl der beobachtete Exoproteasephänotyp bei Inaktivierung der *aprAs* Transkription (siehe Kapitel 4.3.1), als auch die starke Überexpression von AprAs zur Komplementation des Exoproteasephänotyps (siehe Kapitel 4.3.2) sind Hinweise dafür, dass *apr* das regulatorische Ziel von AprAs ist.

Die Regulation bei *aprAs/apr* könnte ähnlich einem Toxin/Antitoxinsystem Typ I funktionieren, bei dem eine stark transkribierte kurzlebige Antitoxin-*antisense*-sRNA regulatorisch auf eine schwächer transkribierte, aber langlebigere mRNA

des Toxingens wirkt [199]. Parallelen zum genannten System sind die einander gegenüber positionierte Genlokalisierung von *aprAs* und *apr* und die stärkere Transkriptionsaktivität von *aprAs* gegenüber *apr* (siehe Abbildung 24).

Nun kann basierend auf den RNA-seq Daten zur Halbwertszeit der beiden RNAs in *B. licheniformis* DSM13 keine Aussage getroffen werden. Jedoch ist die mRNA von *aprE*, dem orthologen Gen des *apr* in *B. subtilis* 168, experimentell als langlebig beschrieben [200]. Als Ursache für die hohe Stabilität der *aprE* mRNA wurde eine am 5' Ende der mRNA lokalisierte Schleife beschrieben [201]. Interessanterweise findet sich eine ähnliche Schleifenstruktur auch am 5' Ende der *apr*-mRNA von *B. licheniformis* (siehe Abbildung 36).

Ob die mRNA von *apr* eine ähnliche Langlebigkeit aufweist wie die *aprE*-mRNA, muss experimentell ermittelt werden. Sollte es aber so sein, so könnte AprAs wie bei einem Typ I Toxin/Antitoxinsystem, mit der *apr*-mRNA interagieren und möglicherweise zur Degradation des dsRNA-Komplexes führen, wie es für virale Typ I Toxin/Antitoxinsysteme beschrieben ist [80].

Da *B. subtilis* 168 keine *antisense*-sRNA am *aprE* aufweist [202], ist AprAs spezifisch für *B. licheniformis* DSM13 und stellt damit eine zusätzliche, bis jetzt nicht beschriebene, Regulationsebene am *apr*-Gen dar.

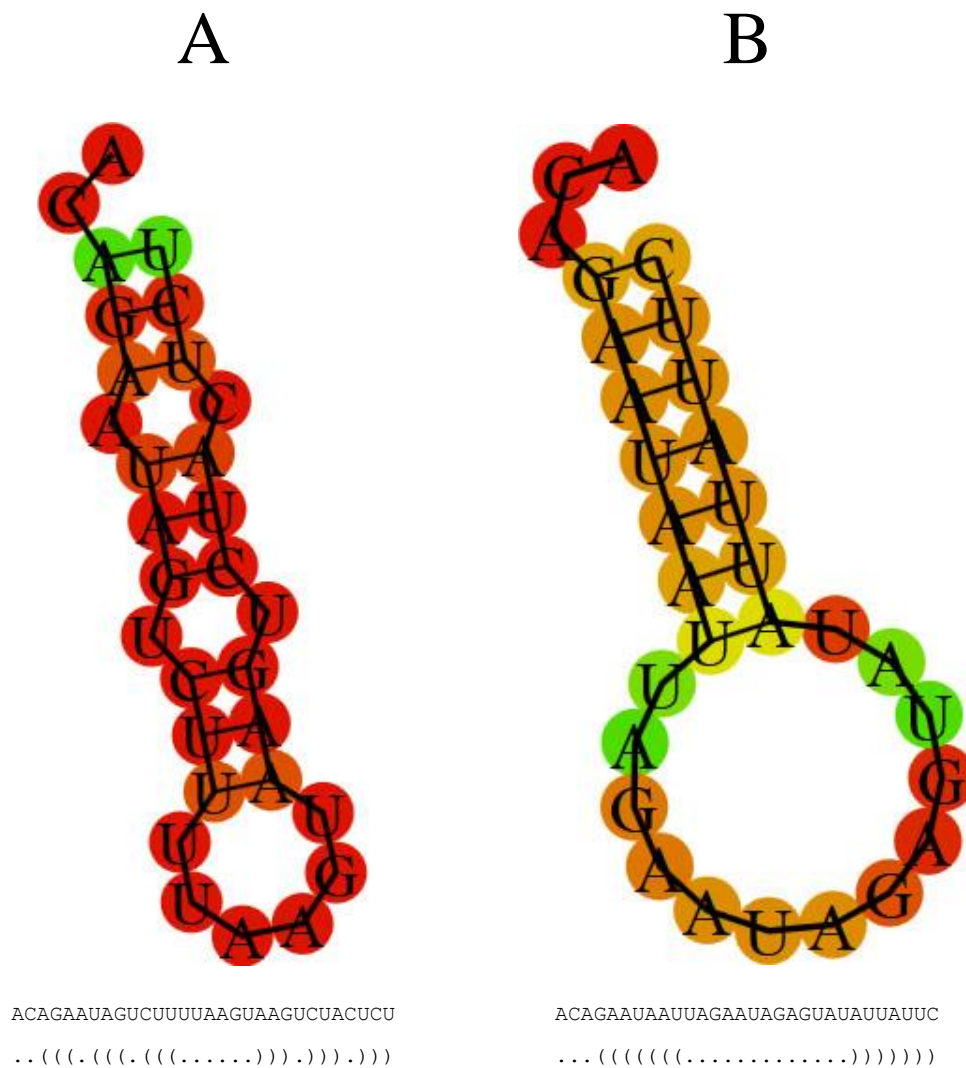


Abbildung 36: Schleife im 5' mRNA-Bereich von *aprE* und *apr*

In **A** ist die stabilisierende 5' mRNA-Schleife des *aprE* Gens aus *B. subtilis* 168 dargestellt und in **B** die bioinformatisch vorhergesagte 5' mRNA-Schleife des *apr* Gens auf *B. licheniformis* DSM13. Unter den Grafiken sind die zugrundeliegenden Sequenz und die Faltmuster dargestellt. Die Erstellung der Grafiken und Faltstrukturen erfolgte mit dem *RNAfold web server* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).

4.4 *Cis*-regulatorische RNA-Elemente in *B. licheniformis* DSM13

Bei der Sortierung von RNA-Elementen aus *B. licheniformis* DSM13 [94], war es möglich 14 Kandidaten für *cis*-regulatorischen Elemente zu identifizieren. Von diesen konnten 13 weiter als solche gestärkt werden. BLi_r2291, verifiziert als kein *cis*-regulatorisches Element, wies Mehrfachinstanzen auf, deren Verteilung mit der Phylogenie der betrachteten Organismen korrelierte.

4.4.1 Sortierung identifizierter RNA-Elemente

Bei der Sortierung der in 5'UTR- und *indep*-kodierte RNA-Elemente aus *B. licheniformis* DSM13 [94] konnte die Gruppe der Kandidaten für neue *cis*-regulatorische Elemente stark eingegrenzt werden. Die Effizienz der Vorgehensweise wird vor allem am Beispiel der 5'UTRs deutlich. Hier konnte die Anzahl der 5'UTRs von 1380 auf 52 reduziert werden unter Beibehaltung von 86,4% der vorhergesagten *cis*-regulatorischen Elemente (siehe Kapitel 3.4.1).

Der Vorteil der in dieser Arbeit entwickelten Herangehensweise liegt in der Einbeziehung von Transkriptomdaten. Damit ist man einen Schritt weiter im Vergleich mit der rein bioinformatischen Methode, bei der systematisch 5'UTR-Bereiche untersucht werden, ohne experimentelle Evidenzen für eine Transkriptionsaktivität einzubeziehen [92, 165–167]. Hierbei können Strukturen postuliert werden, die biologisch keinerlei Funktion haben. Beispielsweise kann die konservierte Lokalisation einer sRNA vor einem Gen und die Ausbildung einer RNA-Sekundärstruktur, die für sRNAs und *cis*-regulatorische Elemente gleichermaßen beobachtet wurden, die Unterscheidung dieser beiden Gruppen auf bioinformatischer Ebene unmöglich machen. Das auf rein bioinformatischem Wege vorhergesagte *cis*-regulatorische Element *ylbH leader* [166], stellt einen solchen Fall dar. Bei der Betrachtung der Transkriptomdaten von *B. licheniformis* DSM13 fällt auf, dass die vorhergesagte Position des *ylbH leaders* sich nicht mit der Position der potentialen 5'UTR von *ylbH* deckt und vor dieser liegt. Zwischen beiden konnte ein potentieller Sigma A-Promotor identifiziert werden (siehe Abbildung 37). Interessanterweise ist auf dem gegenüberliegenden Strang im *B. licheniformis* DSM13 Transkriptom eine sRNA lokalisiert. Ihre Position korreliert mit der durch Rfam vorhergesagten Lokalisation des *ylbH leaders* [94]. Da sRNAs sowohl auf dem plus als auch dem minus-Strang bioinformatisch erkennbare Sekundärstrukturen kodieren können, ist nur unter Einbeziehung

strangspezifischer Transkriptomdaten diese Art von Vorhersageartefakt vermeidbar.

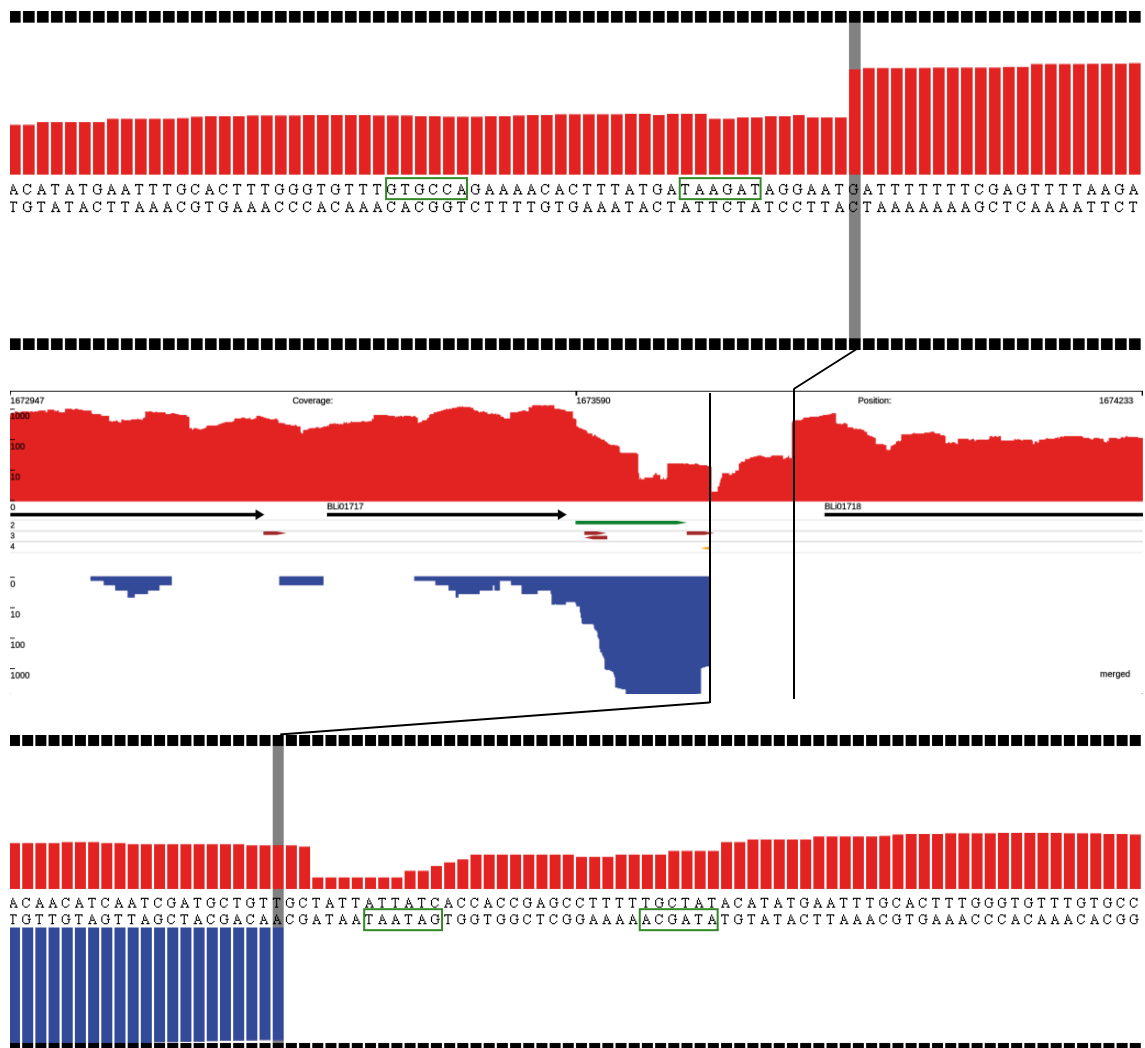


Abbildung 37: Genetische und transkriptionelle Situation am *ylbH*-Gen

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des mit TraV visualisierten Transkriptoms von *B. licheniformis* DSM13 unter industriellen Produktionsbedingungen. Zur Verdeutlichung der Signale wurden die Sequenzen aus mehreren Replikaten vereinigt dargestellt. Die schwarzen Pfeile stellen proteinkodierende Bereiche auf dem Genom dar. Der rote Graph symbolisiert die experimentell ermittelte transkriptionelle Aktivität auf dem Plusstrang und der blaue auf dem Minusstrang. Die Transkriptomdarstellungen und die lokalen Vergrößerungen wurden mit dem Programm TraV [117] generiert. In der Mitte ist eine Gesamtübersicht dargestellt. Der grüne Pfeil stellt die durch Rfam identifizierte Struktur und seine Ausrichtung dar, die braunen Pfeile die vorhergesagten Transkriptionsterminatoren und der gelbe Pfeil, die experimentell ermittelten Transkriptionsstartpunkte. Die über der Gesamtübersicht liegende Vergrößerung stellt die Situation vor dem *ylbH*-Gen dar und die darunter liegende Vergrößerung der mit der Rfam Vorhersage korrelierenden sRNA. Die potentiellen -35 und -10 Box eines potentiellen Sigma A-Promotors sind grün eingerahmt.

4.4.2 Weiteres Potential für regulatorischer RNA-Elemente

Trotz der effizienten Eingrenzung von RNA-Elementen auf potenzielle Kandidaten für neue *cis*-regulatorische Elemente und die korrigierende Funktion des RNA-seq basierten Ansatzes in Bezug auf eine rein bioinformatische Herangehensweise, ist das RNA basierter regulatorische Potential in *B. licheniformis* DSM13 bei weitem nicht erschlossen.

Die für die Sortierung verwendeten 1380 5'UTRs beherbergten nur 44 bioinformatisch vorhergesagten *cis*-regulatorischen Elemente, wobei im Gesamtgenom 65 durch Rfam vorhergesagt wurden [94].

Somit waren bereits vor dem Beginn der Sortierung 32% der *cis*-regulatorischen Elemente nicht berücksichtigt. Eins der 21 nicht einbezogen Elemente war in den indep RNA-Elementen lokalisiert und 20 in Intergenbereichen, für die es nicht möglich war, in den Transkriptomdaten eine 5'UTR eindeutig zu ermitteln. Damit ist die RNA-basierte Suche nach *cis*-regulatorischen Elemente sehr stark vom zugrunde liegenden Transkriptom abhängig. Somit sind RNA-Seq gestützte Vorhersagen von den physiologischen Bedingungen und der damit verbundenen transkriptionellen Aktivität abhängig, unter denen die jeweiligen Proben genommen wurden.

Der hier verwendete Ansatz findet aufgrund der festgelegten Suchparameter *Riboswitches*, die mittels intrinsischer Transkriptionstermination regulieren. Trotz häufiger Erwähnung in der Literatur, ist das nicht der einzige Typ. Weitere, die nicht nach diesem Mechanismus funktionieren, fallen durch das Selektionsraster und sind in der finalen Kandidatenliste nicht aufgeführt. Ein Beispiel sind *Riboswitches*, die mittels des Proteins Rho zur Transkriptionstermination führen [203]. Diese Termination bedarf keines intrinsischen Terminators, was diese Klasse von *Riboswitches*, bei den hier angewandten Sortierkriterien (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11), durchfallen lässt. In dieser Untersuchung sind, allein in der 5'UTR Liste, 72 RNA-Elemente ohne vorhergesagten intrinsischen Terminator, die nicht weiter betrachtet wurden und somit weiteres Potential bergen.

Ein weiteres Beispiel ist der *glmS-Riboswitch* Ribozym aus *B. subtilis*. Seine Funktionsweise basiert nicht auf dem Mechanismus einer vorzeitigen Transkriptionstermination. Dieser *Riboswitch* interagiert mit Glukoseamin-6-phosphat, wobei er sich, bei erfolgreicher Interaktion, selbständig von der vollständig vorliegenden mRNA abspaltet [204]. Die mRNA wird anschließend

von der RNaseJ degradiert was die Translation des Gens unmöglich macht [205]. Im Transkriptom von *B. licheniformis* DSM13 ist die mRNA vor dem kodierenden Bereich des *glmS*-orthologen Gens durch keine erhöhte Sequenzabdeckung aufgefallen und es gab keine passende Vorhersage eines Transkriptionsterminators (siehe Abbildung 38).

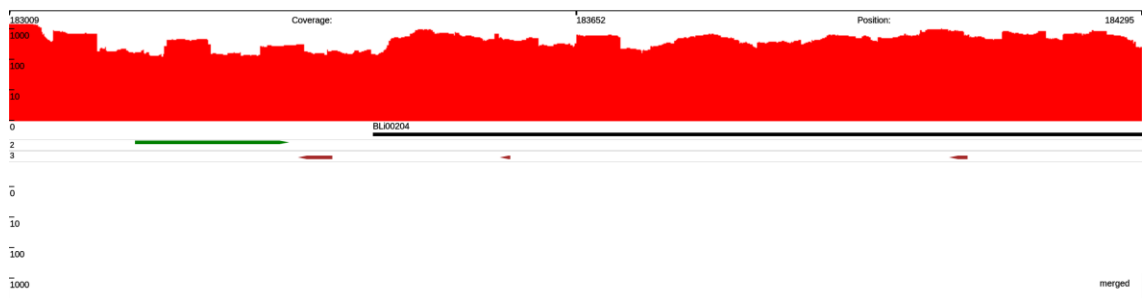


Abbildung 38: Transkriptabdeckung des *glmS*-Riboswitch in *B. licheniformis* DSM13

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des mit TraV visualisierten Transkriptoms von *B. licheniformis* DSM13 unter industriellen Produktionsbedingungen. Zur Verdeutlichung der Signale wurden die Sequenzen aus mehreren Replikaten vereint dargestellt. Die schwarzen Pfeile stellen proteinkodierende Bereiche auf dem Genom dar (hier nur durch einen Balken dargestellt). BLi00204 entspricht dem *glmS*-Gen. Der rote Graph symbolisiert die experimentell ermittelte transkriptionelle Aktivität auf dem Plusstrang des Genoms. Der grüne Pfeil symbolisiert die Lokalisation des durch Rfam vorhergesagten *glmS*-Riboswitch. Die braunen Pfeile symbolisieren vorhergesagte intrinsische Terminatoren (siehe Kapitel 2.7.2). Die vorhergesagte Terminatorstruktur zwischen *glmS*-Riboswitch und *glmS*-Gen ist gegenläufig orientiert.

Ein *Riboswitch*, der zum Zeitpunkt der Transkriptomerstellung vollständig auf "An" geschaltet war, würde auch keine Berücksichtigung finden, da er über die Differenz der Transkriptomabdeckung der 5'UTR, bezogen auf den kodierenden Bereich in der mRNA, nicht gefiltert werden könnte. In dieser Arbeit traf das zum Beispiel auf den Cobalamin-*Riboswitch* zu (siehe Abbildung 39).

Somit deuten die angeführten Beispiele auf weiteres Potential für RNA basierte Regulatoren in *B. licheniformis* DSM13.

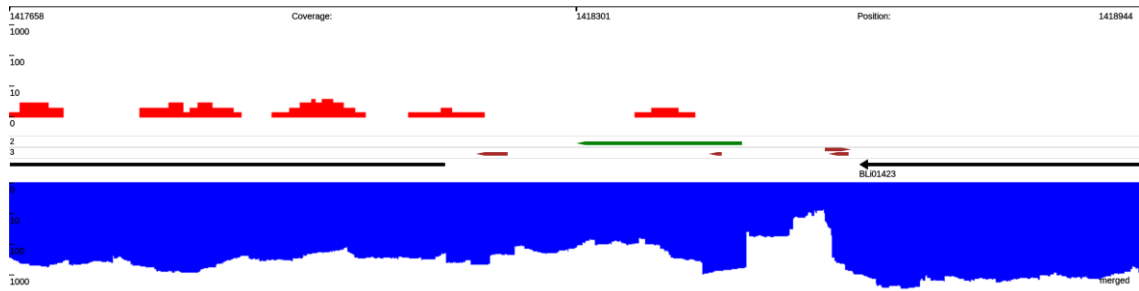


Abbildung 39: Transkriptabdeckung des Cobalamin-Riboswitch in *B. licheniformis* DSM13

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des mit TraV visualisierten Transkriptom von *B. licheniformis* DSM13 unter industriellen Produktionsbedingungen. Zur Verdeutlichung der Signale wurden die Sequenzen aus mehreren Replikaten vereinigt dargestellt. Die schwarzen Pfeile stellen proteinkodierende Bereiche auf dem Genom dar. Der rote Graph symbolisiert die experimentell ermittelte transkriptionelle Aktivität auf dem Plusstrang und der blaue auf dem Minusstrang. Der grüne Pfeil symbolisiert den Kovarianzmodell-Treffer des Cobalamin-Riboswitch und entspricht seiner Ausrichtung. Die braunen Pfeile symbolisieren vorhergesagte intrinsische Terminatoren (siehe Kapitel 2.7.2). Der Cobalamin-Riboswitch ist unter den experimentellen Bedingungen auf „An“ geschaltet. Sein Transkriptionsmuster lässt ihn durch die angewandten Selektionskriterien durchfallen.

4.4.3 Kovarianzmodelle

Es ist beobachtet worden, dass *Riboswitches* in mehreren Kopien, vor verschiedenen Genen eines Regulons, vorkommen. Ein bekanntes und sehr abundantes Beispiel dafür ist der *SAM-Riboswitch*. Im Genom von *B. licheniformis* DSM13 sind 10 Kopien von diesem identifiziert worden [94]. Mittels eines Kovarianzmodells (siehe Kapitel 2.7.4), welches auf Grundlage des zufällig ausgewählten *SAM-Riboswitches* vor dem *yxjG*-Gen (mögliche Methioninsynthase) erstellt wurde, war es hier möglich alle weiteren im Genom vorliegende *SAM-Riboswitch*-Strukturen zu identifizieren. Diese Positivkontrolle zeigte, dass die Suche nach strukturverwandten Elementen durch die Verwendung von Kovarianzmodellen ein guter Weg ist, um die in dieser Arbeit identifizierten 14 Kandidaten neuer *cis*-regulatorischer Elemente zu untersuchen. Dabei sollten auch Instanzen identifiziert werden können, die in Intergenbereichen lokalisiert sind und im Transkriptom nicht direkt als solche auffallen (siehe Kapitel 4.4.1).

Die Suche nach strukturverwandten Elementen hatte in erster Linie das Ziel diese auf ihre Konsistenz als *cis*-regulatorisches Element zu überprüfen. Das ist weitgehend gelungen, da beim Vorliegen eines guten Treffers in den Vergleichsstämmen immer ein Gen in *cis*-Orientierung identifiziert werden

konnte. Des Weiteren sollten durch das Identifizieren von Genen mit einem ähnlichen *cis*-regulatorischen Element, Anhaltspunkte für potentielle Interaktionspartner gefunden werden. Das RNA-Element BLi_r0142, welches in *B. licheniformis* 9945A und weiteren Stämmen bis zu zwei Treffer hatte, ist ein solides Beispiel, welches später separat diskutiert wird.

Die Benutzung der Kovarianzmodelle half auch Fehleinschätzungen zu identifizieren. So ist das RNA-Element BLi_r2291 dadurch aufgefallen, dass sein Kovarianzmodell sehr viele Treffer generierte. Die betreffenden Regionen wiesen transkriptionelle Aktivität auf und stützten somit die Vorhersage. Die Verteilung und Lokalisation der Treffer offenbarte aber, dass es sich bei diesem Element nicht um eine *cis*-regulatorische RNA handelt, da deren Instanzen oft am 3'Ende oder als *antisense* auftraten (siehe Abbildung 32).

Das Kovarianzmodell des RNA-Elements BLi_r0735 war das Einzige das neben einem Treffer auf die eigene Ursprungssequenz eine weitere potentielle *cis*-regulatorische Einheit, im Genom von *B. licheniformis* DSM13, getroffen hat. Hierbei handelte es sich um BLi_r3226. Allerdings hat das Kovarianzmodell von BLi_r3226 keinen Treffer auf den Bereich von BLi_r0735 erreicht. In beiden Fällen handelt es sich beim folgenden Gen um einen Bestandteil eines ABC-Transporters (siehe Tabelle 12). Es wäre denkbar, dass die Interaktionspartner der beiden potentiellen *cis*-regulatorischen Elemente zur gleichen Stoffklasse gehören, was zu der beobachteten Ähnlichkeit in der RNA-Struktur beider Elemente führt. Die beiden Elemente könnten somit ähnlich genug sein, um den Treffer des BLi_r0735 Kovarianzmodells auf den BLi_r3226 Sequenzbereich zu ermöglichen, und verschieden genug, um den Treffer des BLi_r3226 Kovarianzmodells auf den BLi_r0735-Sequenzbereich zu verhindern.

4.4.3.1 RNA-Element BLi_2291

Bei der Untersuchung der potentiellen *cis*-regulatorischen Elemente mittels Kovarianzmodellen ist BLi_r2291 aufgefallen. Es ist das einzige RNA-Element, welches pro Genom viele relevante Treffer erzielte. Dass es sich dabei um ein Artefakt handelt, ist aus drei Gründen unwahrscheinlich. Erstens zeigt das *Alignment* der 16 in *B. licheniformis* DSM13 identifizierten Instanzen (siehe Abbildung 33), dass diese in ihrer Sequenz und möglichen Sekundärstruktur konserviert sind. Zweitens haben die Positionen der Treffer sehr häufig Transkriptabdeckung im Transkriptom von *B. licheniformis* DSM13 (siehe

Abbildung 32). Drittens, die Verteilung von BLi_r2291-Instanzen korreliert mit der Taxonomie der Subtilis-Gruppe (*B. licheniformis* 15 bis 22, *B. subtilis* 8 bis 9, *B. pumilus* 56 bis 78, weiteren *Bacillus*-Genome - keine Treffer) (siehe Tabelle 14).

Geht man genauer auf die Anzahl der Treffer dieses Kovarianzmodells in der Subtilis-Gruppe ein, so wird eine klare Abgrenzung einzelner Spezies ersichtlich (siehe Tabelle 14). Betrachtet man die Verteilung der BLi_r2291-Treffer in der *B. licheniformis*-Gruppe, so korreliert diese mit der phylogenetischen Organisation gemäß dem *Multilocus sequence typing* (MLST)-Schema nach Madslie *et al.*, 2012 [146] (siehe Kapitel 2.7.5). In Abbildung 34 ist diese Korrelation dargestellt. Es zeigt sich, dass BLi_r2291 zumindest in der *B. licheniformis*-Gruppe als stammspezifischer Marker verwendet werden kann.

Was die biologische Bedeutung dieses RNA-Elements sein könnte, ist derzeit unklar. Die aktuelle Literatur erwähnt nichts vergleichbares in der Gattung *Bacillus* [206]. Allerdings ist ein Beispiel in der Gattung *Vibrio* erwähnt. Die sRNAs Qrr1-5 sind ähnlich sequenzkonserviert wie BLi_r2291 [82, 207]. Diese sRNAs sind an der Quorum sensing-Regulation beteiligt. In *Vibrio harvayi* werden diese bei niedriger Zelldichte transkribiert und entfalten hier ihre aktive regulatorische Funktion. Die unter ihrer Kontrolle stehenden Gene sind die schnellsten bei der Umstellung von einer hohen zu einer niedrigen Zelldichte [82, 207].

Um auf die Spur der biologischen Bedeutung von BLi_r2291 zu kommen, wäre es interessant Deletionsmutanten dieses RNA-Elements zu erstellen. Dafür würde sich *B. subtilis* 168 als Modell anbieten. Dieser Stamm hat mit 9 Instanzen eine etwa um die Hälfte reduzierte Anzahl an potentiellen Deletionszielen als *B. licheniformis* DSM13 und ist genetisch besser zugänglich. Doch vor jeglicher experimenteller Arbeit, außerhalb von *B. licheniformis* DSM13, sollte überprüft werden, ob die in anderen Stämmen identifizierten Instanzen auch tatsächlich transkribiert werden. Hier wäre neben *B. subtilis* 168 auch ein Vertreter der Spezies *Pumilus* interessant, da dort mit über 50 Treffern des BLi_r2291 Kovarianzmodells eine sehr hohe Dichte an BLi_r2291-Instanzen vorliegt.

4.4.4 Experimentelle Überprüfung einzelner Kandidaten

Die Sortierung der experimentell ermittelten RNA-Elemente (siehe Kapitel 3.4.1) ergab 14 neue Kandidaten für *cis*-regulatorische Elemente. Mittels der Suche mit

Kovarianzmodellen konnten 13 der 14 Kandidaten weiter als *cis*-regulatorische Elemente gestärkt werden (siehe Kapitel 3.4.2). Dennoch handelt es sich immer noch um eine Vorhersage. Darauf aufbauend sollte versucht werden, exemplarisch ein Element auch experimentell als *cis*-regulatorisches Element zu bestätigen.

Zu diesen Zweck wurde BLi_r0736 mit dem angeschlossenen Gen *yrhG*, welches für eine potentiellen Format/Nitrat-Transporter kodiert, und BLi_r2066 mit dem angeschlossenen Gen *yrhE*, welches für eine potentielle Formatdehydrogenase kodiert, experimentell untersucht. Eine Literaturrecherche ergab, dass im Stamm *B. licheniformis* NCIB6346 (DSM8785) die Funktion einer dissimilatorischen Formatdehydrogenase beschrieben ist, die unter anaeroben Bedingungen mit Glukose und Nitrat aktiv ist [109]. Ein Abgleich, mit einer in der Gruppe vorliegenden, nicht öffentlichen, Genomsequenz des Stamms *B. licheniformis* NCIB6346 bestätigte das Vorliegen der orthologen Gene und der 5'UTR-Strukturen von *yrhG* (BLi00990) und *yrhE* (BLi02766). Auf dieser Grundlage wurde die These aufgestellt, dass die beobachtete dissimilatorische Formatdehydrogenaseaktivität in *B. licheniformis* NCIB6346 möglicherweise auf der Aktivität der BLi00990- und BLi02766-orthologen Gene beruht.

Die experimentelle Untersuchung der Promotorregionen zeigte, dass der Promotor der potentiellen Formatdehydrogenase tatsächlich unter den angewandten Bedingungen, bei welchen die Funktion der Formatdehydrogenase experimentell nachgewiesen wurde [109], vorliegt. Dass die beiden untersuchten Promotoren mit unterschiedlichem Verhalten auf die experimentellen Bedingungen reagierten, ist im Einklang mit den vorangehenden Ergebnissen. Die Struktur der vorgeschalteten RNA-Elemente ist unterschiedlich, da die Kovarianzmodelle der beiden Elemente sich gegenseitig nicht fanden (siehe Kapitel 3.4.2).

Die experimentell nachgewiesene Promotoraktivität der potentiellen Formatdehydrogenase ist zwar eindeutig, doch sehr gering, wenn man diese im Verhältnis zur Positivkontrolle betrachtet (siehe Abbildung 35). Daher liegt hier möglicherweise nicht ausgeschöpft Potential vor, in Bezug auf die Aktivierung des betrachteten Promoters. Die Optimierung der experimentellen Bedingungen könnte stärkere Signale generieren. Bevor dies aber geschehen kann, sollte experimentell nachgewiesen werden, dass tatsächlich das Genprodukt von *yrhE* für die von Shariat *et al.*, 1995 [109] beobachtet Formatdehydrogenaseaktivität verantwortlich ist. Sollten die beiden letztgenannten Punkte erfolgreich

abgearbeiteten werden, so ist für den Beweis eines *cis*-regulatorischen Elements immer noch die Identifizierung des Interaktionspartners und der Nachweis der Interaktion nötig.

4.4.4.1 Potentielle *cis*-regulatorische RNA-Elemente BLi_r0484 und BLi_r0142

Die meisten Folge-Gene der 13 von 14 potentiellen *cis*-regulatorischen Elementen (BLi_r2291 ist kein *cis*-regulatorischen Element) haben keine eindeutige Annotation. Das machte eine weitere experimentelle Betrachtung schwierig. Das RNA-Element BLi_r0484, welches vor dem *guaA* Gen lokalisiert ist, gehört zu den Ausnahmen. Das Gen *guaA* kodiert für eine GMP-Synthase, die den Schritt vom Xanthosinmonophosphat (XMP) zu Guanosinemonophosphat (GMP) katalysiert. Bei der Untersuchung des orthologen Gens in *B. subtilis* wurde bereits 1989 eine 5'UTR beobachtet, die eine RNA-Struktur ausbilden könnte [208]. Hierbei handelt es sich aber nicht um den Purin-Riboswitch, der in *B. subtilis* mit Genen des Purin-Stoffwechsels assoziiert ist [68]. Welche Bedeutung die Struktur vor dem *guaA* in *B. subtilis* hat, ist bis heute nicht aufgeklärt. Somit gibt es trotz eindeutiger Annotation keine Anhaltspunkte für einen potentiellen Effektor. Weiterhin kommt hinzu, dass sich die RNA-Struktur vor dem *guaA* aus *B. licheniformis* DSM13, von der aus *B. subtilis* unterscheidet, was sich in den Ergebnissen des Kovarianzmodells von BLi_r0484 widerspiegelt (siehe Tabelle 14). Das genannte Kovarianzmodell hatte außer in Vertretern von *B. licheniformis*, keine Treffer in anderen *Bacillus*-Arten. Somit gibt es im Fall von BLi_r0484 keine Anhaltspunkte für einen potentiellen Effektor. Die Suche nach so einem Effektor müsste systematisch und breit angelegt sein, was im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen war.

Das RNA-Elemente BLi_r0142 ist mit dem *ycbJ*-Gen assoziiert, welches für eine potentielle Macrolide-Phosphotransferase kodiert. Das lässt eine Antibiotikaresistenz vermuten. Das Kovarianzmodell erzielt in *B. licheniformis* 9945A zwei Treffer. Der erste Treffer stellte den orthologen Bereich aus *B. licheniformis* DSM13 dar und der zweite lag exakt vor dem Gen *ermD*. Hierbei handelt es sich um das Gen einer Erythromycin induzierbaren 23S rRNA-Methylase, welche eine Resistenz gegen Erythromycin und seine Derivate vermittelt [209]. Die lange und strukturierte 5'UTR wurde bereits bei der ersten Untersuchung dieses Genes aus *B. licheniformis* 749 durch Gryczan *et al.*, 1984

beobachtet [210]. Es wurde festgestellt, dass die Erythromycin-basierte Induktion in der 5'UTR des *ermD* Genes begründet sein muss, obgleich man den Mechanismus nicht erklären konnte. Die Arbeitsgruppe um Kwak hat sich 1991 [209] am Beispiel von *ermK* aus *B. licheniformis* ERM1, einem Orthologen des *ermD* Genes, erneut damit auseinandergesetzt. Kwak konnte in der 5'UTR von *ermK* einen Transkriptionsterminator beobachten und seine Funktion experimentell *in vitro* nachweisen. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Erythromycin die Transkriptionstermination überwunden wird. Mutationsanalysen von Kwak *et al.*, 1991 [209], als auch von Hue *et al.*, 1992 [211], deuten darauf hin, dass die RNA-Struktur in der 5'UTR entscheidend für die beobachtete Regulation durch Erythromycin ist.

Diese Daten zeigen erneut, dass die in dieser Arbeit etablierten Kriterien zur Sortierung von RNA-Elementen valide sind und vor allem die Integration der "indep" RNA-Elemente richtig war, da BLi_r0142 diese Zuordnung hatte. Experimentell wurde BLi_r0142 nicht beleuchtet, da *B. licheniformis* DSM13 und nicht *B. licheniformis* 9945A im Fokus dieser Arbeit stand. Darüber hinaus ist die Datenlage zum BLi_r0142-Element aus *B. licheniformis* DSM13 nicht so umfangreich wie beim strukturverwandten Element in *B. licheniformis* 9945A.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation hatte die Identifizierung, Analyse und genetische Manipulation RNA-basierter Regulatoren zur Stammoptimierung zum Ziel. Die Grundlage für diese Arbeit waren Transkriptom-Daten aus einer industriellen Subtilisin-Fermentation eines *B. licheniformis* DSM13-Derivats.

Die Entwicklung molekularbiologischer Werkzeuge für die Analyse von RNA-basierten Regulatoren war erfolgreich, und die resultierenden Vektoren wurden in Teilen bereits in den durchgeführten Untersuchungen eingesetzt. Das Kernergebnis dieses Teilprojekts war der *E. coli* / *Bacillus Shuttle*-Vektor pV2. Sein modularer Aufbau erlaubt einen zweckgebundenen Ausbau. Als Beispiel können die in dieser Arbeit erstellten Reporterplasmide angeführt werden.

Das Kernprojekt im Sinne der Erforschung RNA-basierter Regulation war die Untersuchung der *antisense*-sRNA AprAs. Diese sRNA ist komplementär zur mRNA des nativen Subtilisin Gens *apr* in *B. licheniformis* DSM13. Das Ausschalten der AprAs-sRNA führte zum vierfachen Anstieg der native Exoproteaseproduktion, was die reprimierende Natur dieses Elements offenbarte. Diese Erkenntnis ist ein möglicher Schritt zur Produktionsoptimierung und damit ein Beitrag zur Verwirklichung des Gesamtprojekts. Darüber hinaus wurde ein Vorgehen entwickelt, um die in *B. licheniformis* DSM13 identifizierten RNA-Elemente, sinnvoll auf eine überschaubare Anzahl interessanter Kandidaten, für neue *cis*-regulatorische RNAs, zu kondensieren. Damit war es möglich 1380 5'UTR-Elemente auf 3,7% zu reduzieren, unter Beibehaltung von 86,4% der bekannten *cis*-regulatorischen RNA-Strukturen. Von den 14 neuen Kandidaten für *cis*-regulatorische Elemente konnten 13, mittels Kovarianzmodellen, als solche bestärkt werden. Die sRNA BLi_r2291 konnte mit 16 Instanzen in *B. licheniformis* DSM13 beschrieben werden und zeigte mit ihrer Verteilung eine Korrelation mit der Phylogenie von *B. licheniformis*. Diese ist wahrscheinlich die erste beschriebenen sRNA mit multiplen Instanzen in der Gattung *Bacillus*.

Zusätzlich zum Hauptprojekt wurde am Beispiel von *B. licheniformis* DSM13 ein neuer NGS- und Genom-basierter Ansatz zur Evaluation des aktiven Prophagenpotentials entwickelt. Die Effizienz des erarbeiteten Konzepts wurde durch die Identifizierung eines dritten aktiven Prophagen deutlich, der bis dahin in *B. licheniformis* DSM13 nicht als aktiv bekannten war.

6 Ausblick

Das hauptsächliche Augenmerk dieser Arbeit lag auf RNA-basierten Regulatoren. Von den betrachteten Kandidaten sind die sRNAs AprAs, BLi_r2291 und das *cis*-regulatorische Element am *ermD* besonders hervorzuheben.

AprAs ist am *apr*-Gen lokalisiert, welches für Subtilisin Carlsberg kodiert. Diese Exoprotease ist entscheidend für den Aufschluss proteinhaltiger Nährstoffe und der Grund warum *B. licheniformis* Stämme in der Industrie eingesetzt werden. Sollte sich bestätigen, dass die regulatorische Wechselwirkung von *aprAs/apr* ähnlich einem viralen Toxin/Antitoxinsystem Typ I verhält, so wäre *apr* nach meiner Kenntnis das erste beschriebene, metabolisch und industriell relevante Gen reguliert durch diesen Mechanismus.

Im Fall der sRNA BLi_r2291 wurde gezeigt, dass die Instanzenhäufigkeit im Genom eines *B. licheniformis* Stamms als sequenzunabhängiger phylogenetischer Marker benutzt werden kann. In Zukunft sollte geprüft werden, ob das auch in anderen Arten, wie *B. subtilis* oder *B. pumilus*, möglich ist. Da BLi_r2291 in *Bacillus* die erste beschriebene sRNA mit zweistelliger Instanzenanzahl ist, ist das Beleuchten ihrer Rolle im Organismus von großem Interesse. Mit einer bioinformatischen Vorhersage der Zielgene dieser sRNA, wäre es möglich Hinweise auf die biologische Bedeutung zu erhalten.

Neben den sRNAs sollten auch die hier identifizierten Kandidaten für *cis*-regulatorischen Elemente weiter untersucht werden. Vor allem sei auf das *cis*-regulatorische Element des *ermD* aus *B. licheniformis* 9945A hingewiesen, bei dem die gezeigten Eigenschaften alle notwendigen Elemente eines neuen *Riboswitch* haben.

Abgesehen von den genannten RNA-Elementen birgt das hier betrachtete Transkriptom weiterhin riesiges Potential. Es beherbergt viele weiter interessante Kandidaten für regulatorische RNAs, die keine Rfam Treffer haben und somit noch nicht untersucht sind. Es ist faszinierend zu spekulieren was für Erkenntnisse und Einblicke in die Physiologie von *B. licheniformis* zu erwarten sind, wenn man bedenkt, dass die ersten in dieser Arbeit untersuchten RNAs bereits völlig neue Regulationsmechanismen aufdeckten.

7 Quellen

1. Logan NA, De Vos P: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Volume 3: The Firmicutes*. Springer; 2009.
2. Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW: **Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal**. *Nature* 2000, **407**:897–900.
3. Merrill L, Dunbar J, Richardson J, Kuske CR: **Composition of Bacillus Species in Aerosols from 11 U.S. Cities**. *J Forensic Sci* 2006, **51**:559–565.
4. Jaenicke R: **Abundance of Cellular Material and Proteins in the Atmosphere**. *Science (80-)* 2005, **308**:73–73.
5. Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L, Olmedo G: **Understanding the evolutionary relationships and major traits of Bacillus through comparative genomics**. *BMC Genomics* 2010, **11**:332.
6. Guinebretière M-H, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, De Vos P: **Ecological diversification in the Bacillus cereus Group**. *Environ Microbiol* 2008, **10**:851–65.
7. Wang L-T, Lee F-L, Tai C-J, Kasai H: **Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the Bacillus subtilis group**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, **57**(Pt 8):1846–50.
8. Lamenha Luna-Finke C, Finker L: *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. InTech; 2012.
9. Kamle S, Ali S: **Genetically modified crops: detection strategies and biosafety issues**. *Gene* 2013, **522**:123–32.
10. English CF, Bell EJ, Berger AJ: **Isolation of thermophiles from broadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness**. *Appl Microbiol* 1967, **15**:117–9.
11. Röling WF, Kerler J, Braster M, Apriyantono A, Stam H, van Verseveld HW: **Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing**. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:1995–2003.
12. Wang J, Fung DY: **Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation**. *Crit Rev Microbiol* 1996, **22**:101–38.
13. DEBAETS L, VANIWAARDEN P, MEEUS N, SCHIMMEL H, PHILIPP W, EMONS H: **First certified reference materials for molecular fingerprinting of two approved probiotic Bacillus strains**. *Int J Food Microbiol* 2009, **129**:16–20.

14. Schallmeyer M, Singh A, Ward OP: **Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production.** *Can J Microbiol* 2004, **50**:1–17.
15. Llarch a, Logan N, Castellvi J, Prieto M, Guinea J: **Isolation and Characterization of Thermophilic *Bacillus* spp. from Geothermal Environments on Deception Island, South Shetland Archipelago.** *Microb Ecol* 1997, **34**:58–65.
16. Gao Z: **Purification and Characterization of a Novel Lichenase From *Bacillus licheniformis* GZ-2.** *Biotechnol Appl Biochem* 2014.
17. Anbu P, Hur BK: **Isolation of an organic solvent-tolerant bacterium *Bacillus licheniformis* PAL05 which able to secrete solvent-stable lipase.** *Biotechnol Appl Biochem* 2014.
18. Fasimoye FO, Olajuyigbe FM, Sanni MD: **Purification and characterization of a thermostable extracellular phytase from *Bacillus licheniformis* PFBL-03.** *Prep Biochem Biotechnol* 2014, **44**:193–205.
19. Borgi MA, Boudebouze S, Aghajari N, Szukala F, Pons N, Maguin E, Rhimi M: **The attractive recombinant phytase from *Bacillus licheniformis*: biochemical and molecular characterization.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2013.
20. Rehman HU, Aman A, Silipo A, Qader SAU, Molinaro A, Ansari A: **Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support.** *Food Chem* 2013, **139**:1081–6.
21. Lu L, Wang T-N, Xu T-F, Wang J-Y, Wang C-L, Zhao M: **Cloning and expression of thermo-alkali-stable laccase of *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its characterization.** *Bioresour Technol* 2013, **134**:81–6.
22. Nakapong S, Pichyangkura R, Ito K, Iizuka M, Pongsawasdi P: **High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles.** *Int J Biol Macromol* 2013, **54**:30–6.
23. Liu B, Zhang J, Li B, Liao X, Du G, Chen J: **Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing.** *World J Microbiol Biotechnol* 2013, **29**:825–32.
24. Sarker PK, Talukdar SA, Deb P, Sayem SA, Mohsina K: **Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* P003.** *Springerplus* 2013, **2**:506.
25. Pathak AP, Deshmukh KB: **Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: a Lonar soda lake isolate.** *Indian J Exp Biol* 2012, **50**:569–76.

26. Sellami-Kamoun A, Haddar A, Ali NE-H, Ghorbel-Frikha B, Kanoun S, Nasri M: **Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations.** *Microbiol Res* 2008, **163**:299–306.
27. Tang X-M, Shen W, Lakay FM, Shao W-L, Wang Z-X, Prior B a, Zhuge J: **Cloning and over-expression of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*.** *Biotechnol Lett* 2004, **26**:975–9.
28. Tang X-M, Lakay FM, Shen W, Shao W-L, Fang H-Y, Prior B a, Wang Z-X, Zhuge J: **Purification and characterisation of an alkaline protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis*.** *Biotechnol Lett* 2004, **26**:1421–4.
29. Rachadech W, Navacharoen a., Ruangsit W, Pongtharangkul T, Vangnai a. S: **An organic solvent-, detergent-, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5.** *Microbiology* 2010, **79**:620–629.
30. Khairnar RS, Mahabole MP, Pathak AP: **Nanoactivator mediated modifications in thermostable amylase from *Bacillus licheniformis*.** 2012.
31. Zohra RR, Aman A, Zohra RR, Ansari A, Ghani M, Qader SAU: **Dextranase: hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*.** *Carbohydr Polym* 2013, **92**:2149–53.
32. Gomaa EZ: **Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol.** *J Microbiol* 2012, **50**:103–11.
33. Joo H-S, Kumar CG, Park G-C, Paik SR, Chang C-S: **Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties.** *J Appl Microbiol* 2003, **95**:267–72.
34. Clements LD, Miller BS, Streips UN: **Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*.** *Syst Appl Microbiol* 2002, **25**:284–6.
35. Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, Lopez de Leon A, Xiang H, Gusti V, Clausen IG, Olsen PB, Rasmussen MD, Andersen JT, Jørgensen PL, Larsen TS, Sorokin A, Bolotin A, Lapidus A, Galleron N, Ehrlich SD, Berka RM: **Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species.** *Genome Biol* 2004, **5**:R77.
36. Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Bäumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R, Ehrenreich A, Gottschalk G: **The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004, **7**:204–11.

37. Kabisch J, Pratzka I, Meyer H, Albrecht D, Lalk M, Ehrenreich A, Schweder T: **Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for growth on overflow metabolites.** *Microb Cell Fact* 2013, **12**:72.
38. Hamoen LW: **Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators.** *Microbiology* 2003, **149**:9–17.
39. Waschkau B, Waldeck J, Wieland S, Eichstädt R, Meinhardt F: **Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **78**:181–8.
40. Hoffmann K, Wollherr A, Larsen M, Rachinger M, Liesegang H, Ehrenreich A, Meinhardt F: **Facilitation of direct conditional knockout of essential genes in *Bacillus licheniformis* DSM13 by comparative genetic analysis and manipulation of genetic competence.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:5046–57.
41. Ackermann H-W, Prangishvili D: **Prokaryote viruses studied by electron microscopy.** *Arch Virol* 2012, **157**:1843–9.
42. Casjens S: **Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?** *Mol Microbiol* 2003, **49**:277–300.
43. Bondy-Denomy J, Davidson AR: **When a virus is not a parasite: the beneficial effects of prophages on bacterial fitness.** *J Microbiol* 2014, **52**:235–42.
44. Lawrence JG, Hendrix RW, Casjens S: **Where are the pseudogenes in bacterial genomes?** *Trends Microbiol* 2001, **9**:535–540.
45. Garneau JE, Moineau S: **Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations.** *Microb Cell Fact* 2011, **10 Suppl 1**(Suppl 1):S20.
46. Wünsche L: **Importance of bacteriophages in fermentation processes.** *Acta Biotechnol* 1989, **9**:395–419.
47. Christiansen T, Nielsen J: **Production of extracellular protease and glucose uptake in *Bacillus clausii* in steady-state and transient continuous cultures.** *J Biotechnol* 2002, **97**:265–273.
48. Klepikova FS, Beliaeva NN, Zhdanov VG, Tikhonenko AS: **[Virulent and temperate phages of *Bacillus licheniformis*, the producer of bacitracin antibiotic].** *Mikrobiologiya* , **47**:312–8.
49. Huang W, Marmur J: **Characterization of inducible bacteriophages in *Bacillus licheniformis*.** *J Virol* 1970, **5**:237–46.
50. Dawyndt P, Vancanneyt M, De Meyer H, Swings J: **Knowledge accumulation and resolution of data inconsistencies during the integration of**

- microbial information sources.** *IEEE Trans Knowl Data Eng* 2005, **17**:1111–1126.
51. STEENSMA H. Y., ROBERTSON LA: **Lysogeny in Bacillus.** *FEMS Microbiol Lett* 1978, **3**:313–317.
52. Steensma HY, Robertson LA, Elsas JD: **The occurrence and taxonomic value of PBSX-like defective phages in the genus Bacillus.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 1978, **44**:353–366.
53. Casjens S: **Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?** *Mol Microbiol* 2003, **49**:277–300.
54. Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüßow H: **Prophage genomics.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2003, **67**:238–76, table of contents.
55. Casjens SR: **Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages.** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**:451–8.
56. Bose M, Barber RD: **Prophage Finder: a prophage loci prediction tool for prokaryotic genome sequences.** *In Silico Biol* 2006, **6**:223–7.
57. Fouts DE: **Phage_Finder: automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:5839–51.
58. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS: **PHAST: A Fast Phage Search Tool.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Web Server issue):W347–52.
59. Akhter S, Aziz RK, Edwards RA: **PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:e126.
60. Simon M. Cutting CRH: *Molecular Biological Methods for Bacillus.* John Wiley & Sons Ltd; 1990:618.
61. Zeigler DR, Prágai Z, Rodriguez S, Chevreux B, Muffler A, Albert T, Bai R, Wyss M, Perkins JB: **The origins of 168, W23, and other Bacillus subtilis legacy strains.** *J Bacteriol* 2008, **190**:6983–95.
62. Jakobs M, Hoffmann K, Grabke A, Neuber S, Liesegang H, Volland S, Meinhardt F: **Unravelling the genetic basis for competence development of auxotrophic Bacillus licheniformis 9945A strains.** *Microbiology* 2014, **160**(Pt 10):2136–47.
63. Maurer K-H: **Detergent proteases.** *Curr Opin Biotechnol* 2004, **15**:330–4.
64. Nijland R, Burgess JG, Errington J, Veening J-W: **Transformation of environmental Bacillus subtilis isolates by transiently inducing genetic competence.** *PLoS One* 2010, **5**:e9724.

65. Vagner V, Dervyn E, Ehrlich SD: **A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis***. *Microbiology* 1998, **144** (Pt 1:3097–104.
66. Rachinger M, Bauch M, Strittmatter A, Bongaerts J, Evers S, Maurer K-H, Daniel R, Liebl W, Liesegang H, Ehrenreich A: **Size unlimited markerless deletions by a transconjugative plasmid-system in *Bacillus licheniformis***. *J Biotechnol* 2013, **167**:365–9.
67. Pansegrau W, Lanka E, Barth PT, Figurski DH, Guiney DG, Haas D, Helinski DR, Schwab H, Stanisich VA, Thomas CM: **Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis**. *J Mol Biol* 1994, **239**:623–63.
68. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR: **Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus subtilis* and Other Bacteria**. *Cell* 2003, **113**:577–586.
69. Mizuno T, Chou MY, Inouye M: **A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**:1966–70.
70. Tétart F, Bouché JP: **Regulation of the expression of the cell-cycle gene *ftsZ* by DicF antisense RNA. Division does not require a fixed number of FtsZ molecules**. *Mol Microbiol* 1992, **6**:615–20.
71. Irnov I, Sharma CM, Vogel J, Winkler WC: **Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis***. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:6637–51.
72. Grundy FJ, Henkin TM: **From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements**. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2006, **41**:329–38.
73. Waters LS, Storz G: **Regulatory RNAs in bacteria**. *Cell* 2009, **136**:615–28.
74. Winkler WC, Breaker RR: **Genetic control by metabolite-binding riboswitches**. *Chembiochem* 2003, **4**:1024–32.
75. Breaker RR: **Riboswitches and the RNA world**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012, **4**.
76. Brantl S: **Antisense-RNA regulation and RNA interference**. *Biochim Biophys Acta* 2002, **1575**:15–25.
77. Görke B, Vogel J: **Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars**. *Genes Dev* 2008, **22**:2914–25.
78. Babitzke P, Romeo T: **CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins**. *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:156–63.
79. Wassarman KM: **6S RNA: a small RNA regulator of transcription**. *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:164–8.

80. Durand S, Gilet L, Condon C: **The essential function of *B. subtilis* RNase III is to silence foreign toxin genes.** *PLoS Genet* 2012, **8**:e1003181.
81. Sun X, Zhulin I, Wartell RM: **Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:3662–71.
82. Shao Y, Feng L, Rutherford ST, Papenfort K, Bassler BL: **Functional determinants of the quorum-sensing non-coding RNAs and their roles in target regulation.** *EMBO J* 2013, **32**:2158–71.
83. Gottesman S: **Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria.** *Trends Genet* 2005, **21**:399–404.
84. Livny J, Teonadi H, Livny M, Waldor MK: **High-throughput, kingdom-wide prediction and annotation of bacterial non-coding RNAs.** *PLoS One* 2008, **3**:e3197.
85. Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S: **Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq.** *Mol Microbiol* 2003, **50**:1111–1124.
86. Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JCD, Vogel J: **Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq.** *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000163.
87. Turner RJ, Lu Y, Switzer RL: **Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (pyr) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism.** *J Bacteriol* 1994, **176**:3708–22.
88. Webb E, Downs D: **Characterization of thiL, encoding thiamin-monophosphate kinase, in *Salmonella typhimurium*.** *J Biol Chem* 1997, **272**:15702–7.
89. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR: **Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression.** *Nature* 2002, **419**:952–6.
90. Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR: **An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:15908–13.
91. Griffiths-Jones S, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Eddy SR, Bateman A: **Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(Database issue):D121–4.
92. Weinberg Z, Barrick JE, Yao Z, Roth A, Kim JN, Gore J, Wang JX, Lee ER, Block KF, Sudarsan N, Neph S, Tompa M, Ruzzo WL, Breaker RR: **Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:4809–19.

93. Barrick JE, Breaker RR: **The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches.** *Genome Biol* 2007, **8**:R239.
94. Wiegand S, Dietrich S, Hertel R, Bongaerts J, Evers S, Volland S, Daniel R, Liesegang H: **RNA-Seq of *Bacillus licheniformis*: active regulatory RNA features expressed within a productive fermentation.** *BMC Genomics* 2013, **14**:667.
95. Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW: **Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.** *Nucleic Acids Res* 1989, **17**:3469–78.
96. Simon R, Priefer U, Pühler A: **A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria.** *Nat Biotechnol* 1983, **1**:784–791.
97. Rachinger M, Volland S, Meinhardt F, Daniel R, Liesegang H: **First Insights into the Completely Annotated Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* Strain 9945A.** *Genome Announc* 2013, **1**.
98. List V: **Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2003, **53**(Pt 6):1701–2.
99. Gugliandolo C, Maugeri TL, Caccamo D, Stackebrandt E: ***Bacillus aeolius* sp. nov. a novel thermophilic, halophilic marine *Bacillus* species from Eolian Islands (Italy).** *Syst Appl Microbiol* 2003, **26**:172–6.
100. Pukall R, Schumann P, Clermont D, Bizet C: ***Bacillus aeolius* DSM 15084T (=CIP 107628T) is a strain of *Bacillus licheniformis*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, **58**(Pt 5):1268–70.
101. Spizizen J: **TRANSFORMATION OF BIOCHEMICALLY DEFICIENT STRAINS OF *BACILLUS SUBTILIS* BY DEOXYRIBONUCLEATE.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1958, **44**:1072–8.
102. BURKHOLDER PR, GILES NH: **Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*.** *Am J Bot* 1947, **34**:345–8.
103. Lewis PJ, Marston AL: **GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*.** *Gene* 1999, **227**:101–109.
104. Keggins KM, Lovett PS, Duvall EJ: **Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, **75**:1423–7.
105. Stülke J, Martin-Verstraete I, Zagorec M, Rose M, Klier A, Rapoport G: **Induction of the *Bacillus subtilis* ptsGHI operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT.** *Mol Microbiol* 1997, **25**:65–78.

106. Weinrauch Y, Msadek T, Kunst F, Dubnau D: **Sequence and properties of comQ, a new competence regulatory gene of Bacillus subtilis.** *J Bacteriol* 1991, **173**:5685–93.
107. Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (3 Volume Set)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
108. Anagnostopoulos C, Spizizen J: **REQUIREMENTS FOR TRANSFORMATION IN BACILLUS SUBTILIS.** *J Bacteriol* 1961, **81**:741–6.
109. Shariat P, Mitchell WJ, Boyd A, Priest FG: **Anaerobic metabolism in Bacillus licheniformis NCIB 6346.** *Microbiology* 1995, **141**:1117–1124.
110. Tillett D, Neilan BA: **Enzyme-free cloning : a rapid method to clone PCR products independent of vector restriction enzyme sites.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:26–28.
111. Leenhouts KJ, Kok JAN, Venema G: **Campbell-like integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of Campbell-Like Integration of Heterologous Plasmid DNA into the Chromosome of Lactococcus lactis subsp . lactis.** 1989.
112. Miller JH: *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,U.S.; 1972:352–355.
113. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248–54.
114. Cupp-Enyard C: **Sigma’s Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate.** *J Vis Exp* 2008.
115. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463–7.
116. Bennett S: **Solexa Ltd.** *Pharmacogenomics* 2004, **5**:433–8.
117. Dietrich S, Wiegand S, Liesegang H: **TraV: A Genome Context Sensitive Transcriptome Browser.** *PLoS One* 2014, **9**:e93677.
118. Langmead B, Salzberg SL: **Fast gapped-read alignment with Bowtie 2.** *Nat Methods* 2012, **9**:357–9.
119. Kingsford CL, Ayanbule K, Salzberg SL: **Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake.** *Genome Biol* 2007, **8**:R22.
120. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**:403–10.

121. O'Donovan C, Martin MJ, Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A, Apweiler R: **High-quality protein knowledge resource: SWISS-PROT and TrEMBL.** *Brief Bioinform* 2002, **3**:275–84.
122. Hunter S, Jones P, Mitchell A, Apweiler R, Attwood TK, Bateman A, Bernard T, Binns D, Bork P, Burge S, de Castro E, Coggill P, Corbett M, Das U, Daugherty L, Duquenne L, Finn RD, Fraser M, Gough J, Haft D, Hulo N, Kahn D, Kelly E, Letunic I, Lonsdale D, Lopez R, Madera M, Maslen J, McAnulla C, McDowall J, et al.: **InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(Database issue):D306–12.
123. Kiryu H, Tabei Y, Kin T, Asai K: **Murlet: a practical multiple alignment tool for structural RNA sequences.** *Bioinformatics* 2007, **23**:1588–98.
124. Nawrocki EP, Eddy SR: **Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches.** *Bioinformatics* 2013, **29**:2933–5.
125. Li L, Su F, Wang Y, Zhang L, Liu C, Li J, Ma C, Xu P: **Genome sequences of two thermophilic *Bacillus licheniformis* strains, efficient producers of platform chemical 2,3-butanediol.** *J Bacteriol* 2012, **194**:4133–4.
126. Sayem SA, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A, Zanfardino A, De Felice M, Varcamonti M: **Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*.** *Microb Cell Fact* 2011, **10**:74.
127. Yangtse W, Zhou Y, Lei Y, Qiu Y, Wei X, Ji Z, Qi G, Yong Y, Chen L, Chen S: **Genome sequence of *Bacillus licheniformis* WX-02.** *J Bacteriol* 2012, **194**:3561–2.
128. Zeigler DR: **The genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23: insights into speciation within the *B. subtilis* complex and into the history of *B. subtilis* genetics.** *Microbiology* 2011, **157**(Pt 7):2033–41.
129. Belda E, Sekowska A, Le Fèvre F, Morgat A, Mornico D, Ouzounis C, Vallenet D, Médigue C, Danchin A: **An updated metabolic view of the *Bacillus subtilis* 168 genome.** *Microbiology* 2013, **159**(Pt 4):757–70.
130. Gibbons HS, Broomall SM, McNew LA, Daligault H, Chapman C, Bruce D, Karavis M, Krepps M, McGregor PA, Hong C, Park KH, Akmal A, Feldman A, Lin JS, Chang WE, Higgs BW, Demirev P, Lindquist J, Liem A, Fochler E, Read TD, Tapia R, Johnson S, Bishop-Lilly KA, Detter C, Han C, Sozhamannan S, Rosenzweig CN, Skowronski EW: **Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical biowarfare simulant.** *PLoS One* 2011, **6**:e17836.
131. Tirumalai MR, Fox GE: **An ICEBs1-like element may be associated with the extreme radiation and desiccation resistance of *Bacillus pumilus* SAFR-032 spores.** *Extremophiles* 2013, **17**:767–74.

132. Hua D, Ma C, Lin S, Song L, Deng Z, Maomy Z, Zhang Z, Yu B, Xu P: **Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: identification of major metabolites.** *J Biotechnol* 2007, **130**:463–70.
133. Tirumalai MR, Rastogi R, Zamani N, O’Bryant Williams E, Allen S, Diouf F, Kwende S, Weinstock GM, Venkateswaran KJ, Fox GE: **Candidate genes that may be responsible for the unusual resistances exhibited by *Bacillus pumilus* SAFR-032 spores.** *PLoS One* 2013, **8**:e66012.
134. Borriss R, Chen X-H, Rueckert C, Blom J, Becker A, Baumgarth B, Fan B, Pukall R, Schumann P, Spröer C, Junge H, Vater J, Pühler A, Klenk H-P: **Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genom.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2011, **61**(Pt 8):1786–801.
135. Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Süßmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R: **Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**:1007–14.
136. Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, Bhattacharyya A, Reznik G, Mikhailova N, Lapidus A, Chu L, Mazur M, Goltsman E, Larsen N, D’Souza M, Walunas T, Grechkin Y, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Ehrlich SD, Overbeek R, Kyrpides N: **Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*.** *Nature* 2003, **423**:87–91.
137. Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Holtzapple EK, Okstad OA, Helgason E, Rilstone J, Wu M, Kolonay JF, Beanan MJ, Dodson RJ, Brinkac LM, Gwinn M, DeBoy RT, Madpu R, Daugherty SC, Durkin AS, Haft DH, Nelson WC, Peterson JD, Pop M, Khouri HM, Radune D, et al.: **The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria.** *Nature* 2003, **423**:81–6.
138. He J, Shao X, Zheng H, Li M, Wang J, Zhang Q, Li L, Liu Z, Sun M, Wang S, Yu Z: **Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171.** *J Bacteriol* 2010, **192**:4074–5.
139. Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, Willner K, Nolan N, Lentz S, Thomason MK, Sozhamannan S, Mateczun AJ, Du L, Read TD: **Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*.** *Genome Res* 2012, **22**:1512–24.

140. Lapidus A, Goltsman E, Auger S, Galleron N, Ségurens B, Dossat C, Land ML, Broussolle V, Brillard J, Guinebretiere M-H, Sanchis V, Nguen-The C, Lereclus D, Richardson P, Wincker P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A: **Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity.** *Chem Biol Interact* 2008, **171**:236–49.
141. Eppinger M, Bunk B, Johns MA, Edirisinghe JN, Kutumbaka KK, Koenig SSK, Creasy HH, Rosovitz MJ, Riley DR, Daugherty S, Martin M, Elbourne LDH, Paulsen I, Biedendieck R, Braun C, Grayburn S, Dhingra S, Lukyanchuk V, Ball B, Ul-Qamar R, Seibel J, Bremer E, Jahn D, Ravel J, Vary PS: **Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319.** *J Bacteriol* 2011, **193**:4199–213.
142. Shirai T, Suzuki a, Yamane T, Ashida T, Kobayashi T, Hitomi J, Ito S: **High-resolution crystal structure of M-protease: phylogeny aided analysis of the high-alkaline adaptation mechanism.** *Protein Eng* 1997, **10**:627–34.
143. Takami H, Nakasone K, Takaki Y, Maeno G, Sasaki R, Masui N, Fuji F, Hiramata C, Nakamura Y, Ogasawara N, Kuhara S, Horikoshi K: **Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:4317–31.
144. Janto B, Ahmed A, Ito M, Liu J, Hicks DB, Pagni S, Fackelmayer OJ, Smith T-A, Earl J, Elbourne LDH, Hassan K, Paulsen IT, Kolstø A-B, Tourasse NJ, Ehrlich GD, Boissy R, Ivey DM, Li G, Xue Y, Ma Y, Hu FZ, Krulwich TA: **Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4.** *Environ Microbiol* 2011, **13**:3289–309.
145. Su F, Yu B, Sun J, Ou H-Y, Zhao B, Wang L, Qin J, Tang H, Tao F, Jarek M, Scharfe M, Ma C, Ma Y, Xu P: **Genome sequence of the thermophilic strain *Bacillus coagulans* 2-6, an efficient producer of high-optical-purity L-lactic acid.** *J Bacteriol* 2011, **193**:4563–4.
146. Madslien EH, Olsen JS, Granum PE, Blatny JM: **Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme.** *BMC Microbiol* 2012, **12**:230.
147. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S: **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** *Mol Biol Evol* 2013, **30**:2725–9.
148. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673–80.
149. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987, **4**:406–25.

150. Felsenstein J: **Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap.** *Evolution (N Y)* 1985, **39**:783.
151. Tamura K, Nei M, Kumar S: **Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:11030–5.
152. Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R: **InterProScan: protein domains identifier.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(Web Server issue):W116–20.
153. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream M-A, Barrell B: **Artemis: sequence visualization and annotation.** *Bioinformatics* 2000, **16**:944–945.
154. Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Médigue C, Danchin A: **From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later.** *Microbiology* 2009, **155**(Pt 6):1758–75.
155. Needleman SB, Wunsch CD: **A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins.** *J Mol Biol* 1970, **48**:443–453.
156. Rice P, Ian L, Bleasby A: **The European Molecular Biology Open Software Suite EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite.** *Trends Genet* 2000, **16**:276–277.
157. Krogh S, O'Reilly M, Nolan N, Devine KM: **The phage-like element PBSX and part of the skin element, which are resident at different locations on the *Bacillus subtilis* chromosome, are highly homologous.** *Microbiology* 1996, **142** (Pt 8):2031–40.
158. Reents H, Münch R, Dammeyer T, Jahn D, Härtig E: **The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2006, **188**:1103–12.
159. Gaubitz C: **Entwicklung von Reporterplasmiden für Bacilli.** 2010:114.
160. Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, Deckwer W-D, Jahn D: ***Bacillus megaterium*--from simple soil bacterium to industrial protein production host.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **76**:957–67.
161. Johansen LE, Nygaard P, Lassen C, Agersø Y, Saxild HH: **Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL).** *J Bacteriol* 2003, **185**:5200–9.
162. Hirata H, Fukazawa T, Negoro S, Okada H: **Structure of a beta-galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*.** *J Bacteriol* 1986, **166**:722–7.

163. Epshtein V, Mironov AS, Nudler E: **The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:5052–6.
164. Grundy FJ, Henkin TM: **The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in Gram-positive bacteria.** *Mol Microbiol* 1998, **30**:737–749.
165. Yao Z, Weinberg Z, Ruzzo WL: **CMfinder--a covariance model based RNA motif finding algorithm.** *Bioinformatics* 2006, **22**:445–52.
166. Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, Collins J, Lee M, Roth A, Sudarsan N, Jona I, Wickiser JK, Breaker RR: **New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:6421–6.
167. Yao Z, Barrick J, Weinberg Z, Neph S, Breaker R, Tompa M, Ruzzo WL: **A computational pipeline for high- throughput discovery of cis-regulatory noncoding RNA in prokaryotes.** *PLoS Comput Biol* 2007, **3**:e126.
168. Pope WH, Jacobs-Sera D, Best AA, Broussard GW, Connerly PL, Dedrick RM, Kremer TA, Offner S, Ogiefo AH, Pizzorno MC, Rockenbach K, Russell DA, Stowe EL, Stuke J, Thibault SA, Conway JF, Hendrix RW, Hatfull GF: **Cluster j mycobacteriophages: intron splicing in capsid and tail genes.** *PLoS One* 2013, **8**:e69273.
169. Panis G, Franche N, Méjean V, Ansaldi M: **Insights into the functions of a prophage recombination directionality factor.** *Viruses* 2012, **4**:2417–31.
170. Baumgart M, Unthan S, Rückert C, Sivalingam J, Grünberger A, Kalinowski J, Bott M, Noack S, Frunzke J: **Construction of a prophage-free variant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 for use as a platform strain for basic research and industrial biotechnology.** *Appl Environ Microbiol* 2013, **79**:6006–15.
171. Schäfer A, Schwarzer A, Kalinowski J, Pühler A: **Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1994, **176**:7309–19.
172. Casjens SR, Thuman-Commike PA: **Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly.** *Virology* 2011, **411**:393–415.
173. Ackermann H-W: **Bacteriophage taxonomy.** *Microbiol Aust* 2011:90–94.
174. Petrovski S, Dyson ZA, Seviour RJ, Tillett D: **Small but sufficient: the *Rhodococcus* phage RRH1 has the smallest known Siphoviridae genome at 14.2 kilobases.** *J Virol* 2012, **86**:358–63.

175. Ackermann H-W, Krisch HM, Comeau AM: **Morphology and genome sequence of phage Φ 1402: A dwarf myovirus of the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*.** *Bacteriophage* 2011, **1**:138–142.
176. Wiegand S, Voigt B, Albrecht D, Bongaerts J, Evers S, Hecker M, Daniel R, Liesegang H: **Fermentation stage-dependent adaptations of *Bacillus licheniformis* during enzyme production.** *Microb Cell Fact* 2013, **12**:120.
177. Briggs GS, Smits WK, Soultanas P: **Chromosomal replication initiation machinery of low-G+C-content Firmicutes.** *J Bacteriol* 2012, **194**:5162–70.
178. Pintor Rodríguez D: **Charakterisierung induzierbarer Prophagen in *Bacillus licheniformis* DSM13.** 2011.
179. Okamoto K, Mudd JA, Mangan J, Huang WM, Subbaiah TV, Marmur J: **Properties of the defective phage of *Bacillus subtilis*.** *J Mol Biol* 1968, **34**:413–428.
180. Hartford OM, Dowds BCA: **Cloning and characterization of genes induced by hydrogen peroxide in *Bacillus subtilis*.** *J Gen Microbiol* 1992, **138**:2061–2068.
181. Jin T, Zhang X, Zhang Y, Hu Z, Fu Z, Fan J, Wu M, Wang Y, Shen P, Chen X: **Biological and genomic analysis of a PBSX-like defective phage induced from *Bacillus pumilus* AB94180.** *Arch Virol* 2014, **159**:739–52.
182. Jacqueline H: **Der defekte Phage PBLB als Reparaturmechanismus von *Bacillus licheniformis*.** 2010:1–69.
183. Bai Y, D'Aoust F, Smith DL, Driscoll BT: **Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules.** *Can J Microbiol* 2002, **48**:230–238.
184. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: **Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.** *Gene* 1985, **33**:103–19.
185. Lin YL, Blaschek HP: **Transformation of Heat-Treated *Clostridium acetobutylicum* Protoplasts with pUB110 Plasmid DNA.** *Appl Environ Microbiol* 1984, **48**:737–42.
186. Wolk CP, Vonshak A, Kehoe P, Elhai J: **Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**:1561–5.
187. Guiney DG, Hasegawa P, Davis CE: **Plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Bacteroides fragilis*: differential expression of antibiotic resistance phenotypes.** *Proc Natl Acad Sci* 1984, **81**:7203–7206.

188. Bradshaw M, Goodnough MC, Johnson EA: **Conjugative transfer of the Escherichia coli-Clostridium perfringens shuttle vector pJIR1457 to Clostridium botulinum type A strains.** *Plasmid* 1998, **40**:233–7.
189. Carter GP, Awad MM, Hao Y, Thelen T, Bergin IL, Howarth PM, Seemann T, Rood JI, Aronoff DM, Lyras D: **TcsL is an essential virulence factor in Clostridium sordellii ATCC 9714.** *Infect Immun* 2011, **79**:1025–32.
190. Lyras D, Rood JI: **Conjugative transfer of RP4-oriT shuttle vectors from Escherichia coli to Clostridium perfringens.** *Plasmid* 1998, **39**:160–4.
191. Trieu-Cuot P, Carlier C, Martin P, Courvalin P: **Plasmid transfer by conjugation from Escherichia coli to Gram-positive bacteria.** *FEMS Microbiol Lett* 1987, **48**:289–294.
192. Mazodier P, Petter R, Thompson C: **Intergeneric conjugation between Escherichia coli and Streptomyces species.** *J Bacteriol* 1989, **171**:3583–5.
193. Schäfer A, Kalinowski J, Simon R, Seep-Feldhaus AH, Pühler A: **High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative Escherichia coli to various gram-positive coryneform bacteria.** *J Bacteriol* 1990, **172**:1663–6.
194. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science* 1994, **263**:802–5.
195. Gunka K, Stannek L, Care RA, Commichau FM: **Selection-driven accumulation of suppressor mutants in bacillus subtilis: the apparent high mutation frequency of the cryptic gudB gene and the rapid clonal expansion of gudB(+) suppressors are due to growth under selection.** *PLoS One* 2013, **8**:e66120.
196. Overkamp W, Beilharz K, Detert Oude Weme R, Solopova A, Karsens H, Kovács ÁT, Kok J, Kuipers OP, Veening J-W: **Benchmarking various green fluorescent protein variants in Bacillus subtilis, Streptococcus pneumoniae, and Lactococcus lactis for live cell imaging.** *Appl Environ Microbiol* 2013, **79**:6481–90.
197. Jan Utermark PK: **BioTechniques - Quantification of green fluorescent protein fluorescence using real-time PCR thermal cycler.** *Biotechniques* 2006, **41**:150–154.
198. Matsunaga J, Schlax PJ, Haake DA: **Role for cis-Acting RNA Sequences in the Temperature-Dependent Expression of the Multiadhesive Lig Proteins in Leptospira interrogans.** *J Bacteriol* 2013, **195**:5092–101.
199. Jahn N, Preis H, Wiedemann C, Brantl S: **BsrG/SR4 from Bacillus subtilis-the first temperature-dependent type I toxin-antitoxin system.** *Mol Microbiol* 2012, **83**:579–98.

200. Hambræus G, Persson M, Rutberg B: **The aprE leader is a determinant of extreme mRNA stability in Bacillus subtilis.** *Microbiology* 2000, **146 Pt 12**:3051–9.
201. Hambræus G, Karhumaa K, Rutberg B: **A 5' stem-loop and ribosome binding but not translation are important for the stability of Bacillus subtilis aprE leader mRNA.** *Microbiology* 2002, **148(Pt 6)**:1795–803.
202. Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, Becher D, Bisicchia P, Botella E, Delumeau O, Doherty G, Denham EL, Fogg MJ, Fromion V, Goelzer A, Hansen A, Härtig E, Harwood CR, Homuth G, Jarmer H, Jules M, Klipp E, Le Chat L, Lecointe F, Lewis P, Liebermeister W, et al.: **Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in Bacillus subtilis.** *Science* 2012, **335**:1103–6.
203. Hollands K, Proshkin S, Sklyarova S, Epshtein V, Mironov A, Nudler E, Groisman EA: **Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:5376–81.
204. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins J a, Breaker RR: **Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme.** *Nature* 2004, **428**:281–6.
205. Collins JA, Irnov I, Baker S, Winkler WC: **Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme.** *Genes Dev* 2007, **21**:3356–68.
206. Caswell CC, Oglesby-Sherrouse AG, Murphy ER: **Sibling rivalry: related bacterial small RNAs and their redundant and non-redundant roles.** *Front Cell Infect Microbiol* 2014, **4**(October):151.
207. Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni R V, Wingreen NS, Bassler BL: **The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in Vibrio harveyi and Vibrio cholerae.** *Cell* 2004, **118**:69–82.
208. Mäntsälä P, Zalkin H: **Cloning and sequence of Bacillus subtilis purA and guaA, involved in the conversion of IMP to AMP and GMP.** *J Bacteriol* 1992, **174**:1883–90.
209. Kwak J, Choi E, Weisblum B: **Transcriptional attenuation control of ermK , a Transcriptional Attenuation Control of ermK , a Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinant from Bacillus licheniformis.** 1991.
210. Gryczan T, Israeli-Reches M, Del Bue M, Dubnau D: **DNA sequence and regulation of ermD, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance element from Bacillus licheniformis.** *Mol Gen Genet* 1984, **194**:349–56.
211. Hue KK, Bechhofer DH: **Regulation of the Regulation of the Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Gene ermD.** *J Bacteriol* 1992:5860–5868.

8 Anhang

8.1 Ergänzendes Material

Tabelle 17: Phylogenetische Klassifizierung von Prophagenregionen

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi00922	putative TPR regulator	40,6	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi00925	hypothetical protein	30,8	Mycobacterium phage SWU1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi00932	hypothetical protein	34,9	Listeria phage A006	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi00933	putative transposase	32,3	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetali kevirus
BLi00935	putative transposase	34,7	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetali kevirus
BLi00936	putative TPR regulator	42,3	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01317	phage protein XkdA	67,9	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01318	phage transcriptional repressor Xre	88	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01319	phage transcriptional repressor	55,6	Lactobacillus phage phig1e	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01320	phage protein	31,7	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01321	phage protein XkdB	67,8	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01322	phage protein Xkdc	79,7	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01323	phage protein	54,4	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01324	phage protein XkdD	58,3	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01325	phage protein XtrA	77,9	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01326	phage RNA polymerase sigma like factor Xpf	78,1	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01327	phage terminase small subunit XtmA	83,6	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01328	phage terminase large subunit XtmB	88	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01329	phage protein XkdE	82,7	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01330	phage protein XkdF	76,4	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01331	phage putative capsid protein XkdG	93,2	Bacillus subtilis phage PBSX					

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi01332	phage protein YkzL	72,1	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01333	phage protein XkdH	72	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01334	phage protein XkdI	77,8	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01335	phage protein XkdJ	80,1	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01336	phage protein YkzM	72,4	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01337	phage tail sheath protein XkdK	83,5	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01338	phage protein XkdM	97,3	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01339	phage protein XkdN	97,3	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01340	phage protein XkzB	86,3	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01341	phage putative transglycosylase protein XkdO	61,4	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01342	phage putative peptidoglycan binding protein XkdP	90,4	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01343	phage protein XkdQ	88	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01344	phage protein XkdR	71,6	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01345	phage protein XkdS	94,3	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01346	phage putative tail component XkdT	81	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01347	phage protein XkdU	41,8	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01348	phage protein	60,2	Clostridium phage phiCD27	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae		PhiCD191likevirus
BLi01349	phage protein XkdV	36,4	Staphylococcus phage StB27	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01350	phage protein XkdV	37,7	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetalikevirus
BLi01351	phage putative hemolysin like protein XhIA	87,6	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01352	phage protein XhIB	78,2	Bacillus subtilis phage PBSX					

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi01353	phage N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase XlyA	48,9	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01428	phage putative integrase	57,3	Geobacillus phage GBSV1	dsDNA Virus	Caudovirales	n.k. Caudovirales		
BLi01429	phage xkdA like protein YqaB	53,3	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01430	phage putative membrane protein	48,5	Brochothrix phage BL3	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01431	putative phage protein	43,8	Listeria phage B025	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi05016	phage putative repressor	50,6	Staphylococcus phage phiNM	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01433	phage putative repressor YqaE	53,3	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetalikevirus
BLi05017	phage putative repressor	51,2	Enterococcus phage phiEF24C	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	Spounavirinae	n.k. Spounavirinae
BLi01434	putative phage protein	42,9	Geobacillus phage GBSV1	dsDNA Virus	Caudovirales	n.k. Caudovirales		
BLi01436	phage putative antirepressor	54,9	Staphylococcus phage EW	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01437	putative phage protein	49,4	Listeria phage A006	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01438	putative phage protein YqaH	72,8	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi05018	phage related membrane protein	33,9	Pseudomonas phage PA11	dsDNA Virus	n.k. Phage			
BLi01440	phage putative endonuclease YqaJ	66,9	Bacillus virus 1	dsDNA Virus	Caudovirales	n.k. Caudovirales		
BLi01441	phage putative single strand DNA-binding protein YqaK	65,7	Geobacillus phage GBSV1	dsDNA Virus	Caudovirales	n.k. Caudovirales		
BLi01442	phage putative DNA-binding protein YqaL	37,7	Staphylococcus phage phiN315	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01443	phage ATP-binding protein YqaM	60,1	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01444	putative phage protein YqaO	59,2	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01445	putative phage protein	55,4	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01446	putative phage protein	35,1	Geobacillus virus E2	n.k. Phage				

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi01447	putative phage protein	47,8	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetalikevirus
BLi01450	phage YopX like protein	44,2	Enterococcus phage phiEf11	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01451	phage YopX like protein	44,4	Bacillus phage IEBH	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01452	phage putative endodeoxyribo-nuclease YqaN	64,4	Bacillus phage PM1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi05020	putative phage protein	48,1	Bacillus phage PM1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01453	phage putative single strand DNA-binding protein	49,5	Clostridium phage phiCD38-2	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01455	putative phage protein	54	Bacillus phage PM1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01458	putative phage protein	54,5	Bacillus phage BtCS33	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01460	phage transcription associated protein YqaQ	42,3	Staphylococcus phage StauST398-1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01461	putative phage protein	36,2	Enterobacteria phage Phi1	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	Tevenvirinae	T4likevirus
BLi01462	putative phage protein	31,9	Aeromonas phage CC2	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	Tevenvirinae	T4likevirus
BLi01463	phage putative terminase small subunit YqaS	70,5	Clostridium phage phiC2	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae		PhiCD119likevirus
BLi01464	phage putative terminase large subunit YqaT	82,9	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01465	putative phage protein	68,6	Staphylococcus phage phiETA3	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01466	phage minor head structural component	74,4	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01467	putative phage protein	31,2	Enterococcus phage phiFL2A	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01468	putative phage protein	42,9	Clostridium phage phiCD119	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae		PhiCD119likevirus
BLi01469	putative phage protein	71,1	Staphylococcus phage 96	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01470	putative major capsid protein	64,6	Staphylococcus phage StauST398-3	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01471	putative phage protein	49,2	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01473	phage head completion protein	72,8	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi01474	phage head tail joining protein	55,3	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01475	phage head/tail component	68	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01476	phage tail protein	63,8	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01477	phage major tail protein	60	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi05022	putative phage protein	33,6	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01478	putative phage protein	50,3	Staphylococcus phage 37	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01479	putative phage protein	37,5	Enterococcus phage phiFL2A	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01480	phage putative membrane protein	54,8	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01481	phage tail protein	51,8	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01482	putative phage protein	52,1	Bacillus phage SPP1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01483	putative phage protein	35,5	Aeromonas phage 65	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	Tevenvirinae	T4likevirus
BLi01484	phage XhIA like protein XhIA	77,5	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01485	phage XhIB holin-like protein XhIB	82,8	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01486	phage putative glycoside hydrolase	48,1	Listeria phage P40	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01487	mother cell-specific sporulation protein YrkC	67,3	Bacillus phage Fah	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01531	phage putative integrase	42,3	Clostridium phage c-st	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	
BLi01532	phage putative integrase	33,4	Staphylococcus phage phi7401PVL	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01534	putative phage protein	34,2	Clostridium phage c-st	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	
BLi01538	phage ATP-dependent DNA ligase LigB	77,4	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetalikevirus
BLi05024	putative phage protein	44,8	Staphylococcus phage vB SepiS-phiIPLA7					
BLi01542	putative phage protein	66,3	Lactococcus phage KSY1	dsDNA Virus	Caudovirales	Podoviridae	n.k. Podoviridae	
BLi01544	putative phage protein	32,2	Pelagibacter phage HTVC010P	dsDNA Virus	Caudovirales	Podoviridae	n.k. Podoviridae	
BLi01546	putative phage protein	33,5	Lactobacillus phage A2	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi05026	putative phage protein	50,4	Staphylococcus phage phi2958PVL	n.k. Phage				

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi01547	phage terminase small subunit	74,8	Staphylococcus phage tp310-2	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01548	phage terminase large subunit	69,3	Staphylococcus phage phiSLT	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01549	phage portal protein	58,1	Staphylococcus phage 42E	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01550	phage putative ATP-dependent CLP protease	64,1	Lactobacillus phage JCL1032	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01551	phage putative capsid protein	64,4	Staphylococcus phage phiSauS-IPLA35	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01552	putative phage protein	46,7	Enterococcus phage BC-611	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01553	phage putative DNA packagen protein	57,9	Bacillus phage phiS3501	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01554	phage head-tail joining protein	61,1	Geobacillus virus E2	n.k. Phage				
BLi01555	putative phage protein	56,5	Clostridium phage phiCD6356	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01556	phage major tail protein	52,2	Bacillus phage BtCS33	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01558	putative phage protein	59,1	Bacillus phage WBeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01559	phage putative tail component YqbO	42	Listeria phage B025	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01560	phage putative tail component	65,7	Geobacillus virus E2	n.k. Phage				
BLi01561	phage putative tail component	40,5	Bacillus phage PM1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01562	putative phage protein	40,7	Bacillus phage SPO1	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	Spounavirinae	Spounalikevirus
BLi01563	putative phage protein XkdV	41,4	Bacillus phage PM1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01564	phage related xkdW like protein XkdW	54,9	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01565	phage related xkdX like protein XkdX	70,7	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi01567	phage holin-like protein	73	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetalikevirus
BLi01568	phage N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-like protein	71,2	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi01569	phage putative holin-like protein	50,5	Listeria phage A500	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi01570	putative phage protein	38,4	Geobacillus virus E2	n.k. Phage				
BLi01571	phage HTH DNA bindig protein	52,6	Bacillus phage phiAGATE	dsDNA Virus	Caudovirales	n.k. Caudovirales		
BLi01572	phage related protein	44,7	Bacillus phage WBeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi01573	phage putative DNA polymerase component YoID	49,1	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetali kevirus
BLi01574	phage putative integrase	49,9	Bacillus phage phBC6A52	n.k. Phage				
BLi02967	putative phage capsid protein	35,4	Bacillus phage B4	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	
BLi02968	phage terminase large subunit	84,8	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi02969	putative phage protein	42,5	Enterococcus phage phiFL3A	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi02970	phage terminase small subunit	37,9	Vibrio phage pVp-1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		T5likevirus
BLi02971	putative phage protein	63,4	Listeria phage B054	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi02972	putative phage protein	31,4	Lactobacillus phage KC5a	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	
BLi02973	putative phage protein	31,1	Staphylococcus phage G1	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	Spounavirinae	Twortlikevirus
BLi02974	putative phage DNA (cytosine-5-)-methyltransferase	36,6	Clostridium phage phiCD27	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae		PhiCD19likevirus
BLi02975	putative phage protein	35,7	Enterococcus phage phiEf11	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi02977	putative phage integrase	34,6	Bacillus phage SPbeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Spbetali kevirus
BLi02978	putative TPR regulator	43	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi02979	putative phage protein	32,9	Pectobacterium phage phiTE	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	
BLi02980	phage transcriptional activator ArpU like	47,2	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03587	putative phage protein	61,5	Bacillus phage PM1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03590	phage putative integrase	47,9	Enterobacteria phage BP-4795	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03591	putative transposase/part of IS element	35,8	Streptomyces phage mu1/6	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03592	phage putative HTH transcription repressor protein	44,6	Mycobacterium phage Wildcat	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi05033	putative phage protein	30,1	Pelagibacter phage HTVC008M	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	
BLi03593	putative phage protein	45,1	Listeria phage A500	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03594	putative phage protein	35,4	Staphylococcus phage JD007	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	
BLi03595	putative phage protein	32,4	Enterobacteria phage RB32	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	Tevenvirinae	T4likevirus
BLi03596	putative phage transposase	33,1	Clostridium phage phiC2	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae		PhiCD19likevirus
BLi03598	putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	49,2	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi03599	phage holin	81,6	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi03600	putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase XhIA like	77,5	Bacillus subtilis phage PBSX					
BLi03601	putative phage protein	54,6	Bacillus phage PM1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03602	putative long tail fibre protein	50,2	Bacillus phage PM1	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03603	putative phage protein	37,7	Listeria phage B025	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03604	putative tail protein with catalytic activity	42,6	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03605	putative tail component	67,7	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03606	putative tail protein with catalytic activity	41,4	Listeria phage B025	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03607	putative phage protein	48,8	Staphylococcus phage phiNM3	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03608	phage major tail protein	51,9	Bacillus phage phiIS3501	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03609	putative phage protein	42	Bacillus phage WBeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03610	putative phage protein	50	Klebsiella phage phiKO2	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03611	putative head-tail joining protein	54,5	Geobacillus virus E2	n.k. Phage				

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi03612	phage putative DNA packaging protein	54	Bacillus phage phiS3501	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03613	putative phage protein	63,5	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03614	phage major capsid protein	56,6	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03615	phage putative peptidase	63,1	Lactobacillus phage JCL1032	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03616	phage portal protein	65,8	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03617	phage related protein	54,7	Lactococcus phage phiL309	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03618	phage terminase large subunit	77,7	Bacillus phage BtCS33	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03619	phage terminase small subunit	63,4	Bacillus phage BtCS33	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi05034	hypothetical protein	64	Bacillus phage phiS3501	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03622	phage transcriptional regulator ArpU like	88,1	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03623	putative phage protein	83,7	Bacillus phage SP10	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	
BLi03624	putative phage protein	71,3	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03626	phage putative DNA endonuclease	97,2	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03627	putative phage protein	89	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03629	phage putative DNA primases	93,3	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03630	putative phage protein	95,2	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03631	putative phage protein	92,3	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03632	putative phage protein	86,5	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03633	putative phage protein	34,6	Mycobacterium phage TM4	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03634	putative phage protein	71,9	Bacillus phage phi105	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae		Lambda likevirus
BLi03635	putative phage protein	57,9	Staphylococcus phage phiN315	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03637	putative phage protein	48,1	Bacillus phage WBeta	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03638	phage putative DNA-binding protein	66,3	Brochothrix phage BL3	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	

Eingabe	Annotation der Eingabe	Needlewert	Gefundener Organismus	Genomart	Ordnung	Familie	Unterfamily	Gattung
BLi05037	putative phage protein	59,3	Lactobacillus phage A2	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi03639	phage integrase	66,7	Staphylococcus phage SpaA1	n.k. Phage				
BLi04310	putative phage integrase	30,7	Enterobacteria phage vB KleM-RaK2					
BLi04321	putative phage integrase	36,6	Cronobacter phage vB CsaM GAP32					
BLi04322	putative phage resolvase	34,7	Deep-sea thermophilic phage D6E	dsDNA Virus	n.k. Phage			
BLi04323	putative phage resolvase	45,1	Listeria phage A118	dsDNA Virus	Caudovirales	Siphoviridae	n.k. Siphoviridae	
BLi04325	hypothetical protein	35	Thermus phage phiYS40	dsDNA Virus	Caudovirales	Myoviridae	n.k. Myoviridae	

Die Klassifizierung der Prophagenregionen aus *B. licheniformis* DSM13 erfolgte wie im Kapitel 2.7.7 beschrieben. Die Ergebnisse der einzelnen Prophagen BLi_Pp1 bis BLi_Pp7 sind der Reihenfolge nach geordnet und farblich voneinander abgetrennt. Die in der Tabelle aufgeführten Informationen wurden den Originalgenomdaten entnommen. Lagen keine Informationen vor so wurde in der Tabelle das betreffende Feld leer belassen.

Tabelle 18: β -Galaktosidase-Aktivität der Promotoren von BLi_05060 und BLi_r1585 im pV3SDlacZ Reportersystem

Zeit	Experiment 1				Experiment 2			
	A	B	C	D	A	B	C	D
4 h	7,38	40,3	85,27	189,18	7,39	39,32	99,68	229,52
6 h	3,96	37,91	163,94	414,53	3,88	37,33	213	458,3
8 h	6,97	35,51	323,19	360,58	6,1	31,7	360,46	450,89
10 h	15,08	28,81	661,72	296,14	17,63	30	667,85	354,92

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde ermittelt wie in Kapitel 2.4.3.1 beschrieben und ist in Miller Units dargestellt. Die Probennahme erfolgte nach 4, 6, 8, und 10 h. **A** = *B. licheniformis* DSM13, **B** = *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ, **C** = *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ_P_{BLi_05060}, **D** = *B. licheniformis* DSM13 pV3SDlacZ_P_{BLi_r1585}

Tabelle 19: β -Galaktosidase-Aktivität des narGHII Promotor im pV3lacZ Reportersystem unter aeroben Bedingungen

Zeit	Experiment 1			Experiment 2			Experiment 3		
	WT	LV	P _{narG}	WT	LV	P _{narG}	WT	LV	P _{narG}
2.5 h	1,55	2,91	13,37	3,34	4,05	16,37	2,95	6,52	4,18
5 h	1,49	3,43	8,24	2,57	2,09	6,08	3,93	4,36	1,19
7.5 h	0,00	0,00	9,55	2,19	0,00	5,46	1,71	2,06	2,73
10 h	1,31	0,84	3,34	0,00	0,00	4,66	1,42	0,00	3,11

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde ermittelt wie im Kapitel 2.4.3.1 beschrieben und ist in Miller Units dargestellt. Die Probennahme erfolgte nach 2.5, 5, 7.5, und 10 h. Die Stämme WT (Wildtyp) = *B. licheniformis* MW3, LV (Leervektor) = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ, P_{narG} = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ_P_{narGHII} wurden untersucht.

Tabelle 20: β -Galaktosidase-Aktivität des narGHII Promotor im pV3lacZ Reportersystem unter anaeroben Bedingungen

Zeit	Experiment 1			Experiment 2			Experiment 3		
	WT	LV	P _{narG}	WT	LV	P _{narG}	WT	LV	P _{narG}
2.5 h	14,53	3,56	133	7,13	10,70	439	7,29	4,96	451
5 h	3,75	3,79	1940	7,83	7,38	1851424	6,00	4,33	2538245
7.5 h	2,86	3,03	1978812	2,63	4,15	2135424	5,18	5,12	1927941
10 h	3,67	2,44	1642060	0,00	1,94	1789643	4,47	4,06	1743208

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde ermittelt wie im Kapitel 2.4.3.1 beschrieben und ist in Miller Units dargestellt. Die Probennahme erfolgte nach 2.5, 5, 7.5, und 10 h. Die Stämme WT (Wildtyp) = *B. licheniformis* MW3, LV (Leervektor) = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ, P_{narG} = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ_P_{narGHII} wurden untersucht.

Tabelle 21: β -Galaktosidase-Aktivität der Promotoraktivität von *yrhG* und *yrhE* unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat

	Experiment 1				Experiment 2				Experiment 3			
	WT	LV	P _{yrhE}	P _{yrhG}	WT	LV	P _{yrhE}	P _{yrhG}	WT	LV	P _{yrhE}	P _{yrhG}
2,5 h	14,53	3,56	2,91	4,18	7,13	10,7	13,95	6,25	7,29	4,96	11,96	8,02
5 h	3,75	3,79	21,5	18,36	7,83	7,38	22,52	1,17	6	4,33	18,25	7,23
7,5 h	2,86	3,03	19,97	6,24	2,63	4,15	22,17	5,46	5,18	5,12	17,71	5,97
10 h	3,67	2,44	26,66	3,93	0	1,94	25,14	4,68	4,47	4,06	25,74	5,76

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde ermittelt wie im Kapitel 2.4.3.1 beschrieben und ist in Miller Units dargestellt. Die Probennahme erfolgte nach 2.5, 5, 7.5, und 10 h. Die Stämme WT (Wildtyp) = *B. licheniformis* MW3, LV (Leervektor) = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ, P_{yrhE} = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ_P_{yrhE}, P_{yrhG} = *B. licheniformis* MW3 pV3lacZ_P_{yrhG} wurden untersucht.

Tabelle 22: Exoproteaseaktivität von *B. licheniformis* MW3 und MW3 AprAs⁻

Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
MW3	MW3 AprAs ⁻	MW3	MW3 AprAs ⁻	MW3	MW3 AprAs ⁻
0.004	0.017	0.004	0.018	0.004	0.019
0.006	0.016	0.006	0.021	0.004	0.018
0.004	0.015	0.005	0.017	0.003	0.018
0.005	0.015	0.004	0.025	0.004	0.018

Die Stämme wurden in 4 ml M9-Medium mit Milchpulver auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C unter starkem Schütteln 24 h angezogen. Die Daten wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten erhoben, wie im Kapitel 2.4.3.2 beschrieben.

Tabelle 23: Proteaseaktivität der AprAs-Komplementationsmutanten und Kontrollen

Experiment 1				Experiment 2				Experiment 3			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
0.005	0.017	0.001	0.005	0.006	0.020	0.004	0.005	0.007	0.023	0.004	0.006
0.003	0.015	0.001	0.004	0.005	0.021	0.003	0.005	0.003	0.030	0.002	0.005
0.007	0.015	0.001	0.004	0.005	0.022	0.003	0.004	0.003	0.020	0.002	0.004
0.004	0.020	0.003	0.005	0.005	0.019	0.003	0.004	0.003	0.019	0.003	0.007

Die *B. licheniformis*-Stämme wurden in 4 ml M9-Medium mit Milchpulver auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C unter starkem Schütteln 24 h angezogen. Die Daten wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten erhoben, wie im Kapitel 2.4.3.2 beschrieben. **A** = *B. licheniformis* MW3 pV2, **B** = *B. licheniformis* MW3AprAs⁻ pV2, **C** = *B. licheniformis* MW3 pV2aprAs, **D** = *B. licheniformis* MW3 AprAs⁻ pV2aprAs

8.2 Oligonukleotide

Tabelle 24: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' > 3'
HLRH1	AAAAGGATCCAAGCACCTGAAAAGGTGTCTT
HLRH2	TTTTGGCGCGCCATCGTTCAAATGGTATGCG
HLRH3	AAAAGGATCCGGAAATGTGCGCGGAACC
HLRH5	AAAATGATCACTACTCTTTAATAAAATAATTTTTCCGTTC
HLRH6	TTTTTCGCGCGCGTTCAACAAACGGGCCAGTTTG
HLRH7	AAAAACGCGCGCGTACGACTAGTCTTCGGGGTCATTATAGCG
HLRH8	TTTTTGATCACATCTGTTACGCCGGCG
HLRH12	TTTTACGCGTCTTAAGCCTGCAGGTACCCTAAACCTTCCCGGCTTCATC
HLRH24	TTTTGGCGCGCCTAGGTACGTACGCGTCTGCATTAATGAATCGGCCAAC
HLRH35	GTCGACGCGTACGTAGAGCTCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG
HLRH36	TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG
HLRH37	GGTACCCTTAAGGCGCGCCATCGTTCAAATGGTATGCGTTTTGACACATCCAC
HLRH38	ATCGTTCAAATGGTATGCGTTTTGACACATCCAC
HLRH39	GAGCTCTACGTACGCGTCGACCTAACTTATAGGGGTAACACTTAAAAAAGAATCAATAACG
HLRH40	CTAACTTATAGGGGTAACACTTAAAAAAGAATCAATAACG
HLRH41	GCTAGCGTGCGGCCGCTCGAGCCTTTGATTTAAGTGAACAAGTTTATCCATCAACTATC
HLRH42	CCTTTGATTTAAGTGAACAAGTTTATCCATCAACTATC
HLRH43	CTCGAGCGGCCGACGCTAGCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTGTC
HLRH44	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTGTC
HLRH45	GGCGCGCCTTAAGGGTACCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCC
HLRH46	TTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCC
HLRH55	AGGCTCGAGCGGCCGACGCTAGCATGAATGTGTTATCCTCAATTTGTACGGAGG
HLRH78	AAACTCGAGCTATAAACCCCTTAACTCCGGC
HLRH79	TTTGAATTCCAGTTGATTACATAATCATGCTATC
HLRH80	AAACTCGAGCTTCAAGCGTGACCATGATCAG
HLRH81	TTTGGTACCGCGCTCTTATAGTTTAACTATAAGTGG
HLRH83	AAAAAGCTAGCGCCCAATTCTTCAAACCTGAAAG

Name	Sequenz 5' > 3'
HLRH84	<i>TTGAGCTCGAGAGCAGTAGATTGGATGATATAACG</i>
HLRH87	AAAGGATCCGCTGTCGTCATCAGAGGGCTGTC
HLRH88	GGTCAAAATGTGGTCAAAATCAATTTTAAACAAAAACAAGC
HLRH89	AAATTGATTTTTGACCACTTTTTGACCTTCTTTGTAGTATCTTTTC
HLRH90	<i>TTTTCCATGGCAGCAGCGGAAACGCATCCTTGC</i>
HLRH101	TGTTGCCGGCTGTCAGAATG
HLRH102	CGAACGGCTGATGGAAATCG
HLRH105	ATTCGCAGCATCAGGTAAGG
HLRH106	TGCTCACCGAGTGAGATCAG
HLRH120	AAAGGCGCGCCTCGAGCGGCCCTTAAGGTACCGAATCCCGGGGATC CACAGTAC
HLRH121	<i>TTTGGCGCGCCGGATTTCTTACGCGAAATACGGGC</i>
HLRH208	<i>GAGCTCGAGACCATTTCGACAGCCCGCTTCCATG</i>
HLRH209	AAACCCGGGTTTTTTCATTGCTGGTTCCTCCTTCTGAGTC
HLRH300	AAAGGATCCATTGGGCGGAGCAGACGTCAAAGCG
HLRH301	CTCAATAAC GGCGCGCC ACAAATGGCATATAGAAAAAGCTAGTGTTTTT AGCAC
HLRH302	GCCATTTGT GGCGCGCC GTTATTGAGCGGCAGCTTCGACATTG
HLRH303	<i>TTTTCCATGGCTCGTGTTACGATGGCCTTCAGC</i>
HLRH304	GGCCGATCAGGCAGATATTC
HLRH306	GGGAGCCTTCTCCTGTATGTG
HLRH307	TCTTCCCTGCCAGGTTGAAGC
HLRH308	TTGAGCGGCAGCTTCGACATTG
HLRH309	<u><i>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAC</i></u> CGGGAGCAGCAGCTTTGATCTTG
HLRH320	<i>CTGACGGCGCGCCGACCATCAGGCTCAACAGCG</i>
HLRH321	<i>TGCCCCACGCGTGGATTGTGCTCTGGGATACCAC</i>

Veränderte oder angefügte Basen sind kursiv dargestellt. Zur Klonierung eingesetzte Restriktionsschnittstellen sind fett dargestellt. Die Promotorerkennungssequenz der T7-RNA-Polymerase ist unterstrichen dargestellt. Primer für die Fusion zwei DNA-Sequenzen sind zweifarbig dargestellt (schwarzblau).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Robert Hertel
Geburtsdatum	23.08.1981
Geburtsort	Abaj / Kasachstan
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Verheiratet mit Katarina Hertel, geb. Sterzer, seit 29.07.2006
Kinder	Gabriel Hertel (25.05.2007), Richard Hertel (20.05.2009), Mariana Hertel (9.05.2011)

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit Okt 2010	Dissertation in der Gruppe von Dr. Heiko Liesegang mit dem Titel "Funktionelle Analyse RNA-basierter Regulation des zentralen Energiestoffwechsels in <i>Bacillus licheniformis</i> "
Juli 2009 - März 2010	Diplomarbeit angefertigt in der Gruppe von Prof. Dr. Jörg Stülke mit dem Titel "Die Rolle von Spx bei der Transkription in <i>Mycoplasma pneumoniae</i> "
Apr 2007 - Juni 2009	Hauptstudium Biologie an der Georg August Universität Göttingen, mit dem Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Biochemie und Botanik
Okt 2006 - März 2007	Erasmus Auslandsemester an der Universität in Murcia, Spanien
Okt 2004 - Sep 2006	Vordiplom in Biologie an der Georg August Universität Göttingen

Schulischer Werdegang

Aug 1999 - Juli 2002	Allgemeine Hochschulreife an der Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf
Aug 1994 - Juli 1999	Realschulabschluß an der Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf
Aug 1992 - Juli 1994	Förderstufe an der Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf
Sep 1988 - Juli 1992	Grundschule in Kasachstan und an der Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf

Wehrdienst

Okt 2002 - Juni 2003	ABC AbwBtk 750 / Bruchsal
----------------------	---------------------------

Ehrenamtliche Aktivitäten

Juli 2007 - Apr 2014	Heimsprecher des HRS Studentenwohnheims für Familien in Göttingen
Apr 2004	Sprachunterstützung einer Pfadfinder-Reisegruppe in Russland
Sep 2003 - Juli 2004	Soziales Jahr im <i>Hinwick Hall College of Further Education, England</i>
Feb 2000 - Feb 2005	Jugendleiter im Angelsportverein Bad Sooden-Allendorf

Publikationsverzeichnis

Wissenschaftliche Artikel

1. Wiegand S, Dietrich S, Hertel R, Bongaerts J, Evers S, Volland S, Daniel R, Liesegang H: **RNA-Seq of *Bacillus licheniformis*: active regulatory RNA features expressed within a productive fermentation.** *BMC Genomics* 2013, **14**:667.
2. Hertel R, Volland S, Liesegang H: **Conjugative reporter system for the use in *Bacillus licheniformis* and closely related *Bacilli*.** *Lett Appl Microbiol* 2015, **60**:162–7.
3. Hertel R, Pintor-Rodriguez D, Hollensteiner J, Dietrich S, Leimbach A, Hoppert M, Liesegang H, Volland S: **Genome-based identification of active prophage regions by next generation sequencing in *Bacillus licheniformis* DSM13.** *PLoS One* 2015. ([Angenommen am 27.01.2015](#))

Posterpräsentationen

1. Dietrich S, Wiegand S, Hertel R, Liesegang R: **Antisense Transcripts in *Bacillus licheniformis* DSM13 - Insights from RNA-Seq Data.** ProkaGENOMICS 2011 - 5th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics
2. Hertel R, Pintor-Rodriguez D, Hollensteiner J, Gaubitz C, Rachinger M, Hoppert M, Liesegang H: **Analysis of Inducible Pro-Phages in *Bacillus licheniformis* DSM13.** ProkaGENOMICS 2011 - 5th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics
3. Hertel R, Liesegang H: **A plasmid toolkit for the analysis of regulatory elements in *Bacillus licheniformis*.** VAAM-Jahrestagung 2012
4. Hertel R, Dietrich S, Liesegang H, Volland S: **Identification of regulatory RNA elements in *Bacillus licheniformis* DSM13.** 7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms (2013)

Selbständigkeitserklärung

Ich, Robert Hertel, versichere, dass ich die vorliegende Dissertation, mit dem Titel "**Funktionelle Analyse RNA-basierter Regulation des zentralen Energiestoffwechsels in *Bacillus licheniformis***" selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Göttingen, den _____

Robert Hertel