

SspA, ein essentielles kleines säurelösliches Sporenprotein (SASP) für das Keimen der Sporen von *Clostridium acetobutylicum*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von

Daniela Wetzel

geboren am 09.07.1987 in Kyritz

Rostock, 24. September 2015

Gutachter: **Prof. Dr. Hubert Bahl**
Universität Rostock,
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,
Institut für Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie

Prof. Dr. Martin Hagemann
Universität Rostock,
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,
Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzenphysiologie

Datum der Einreichung: 25. September 2015

Datum der Verteidigung: 04. Dezember 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Zielstellung	1
1.2 Der Sporulationsprozess	2
1.3 Die Resistenz von Endosporen	5
1.4 Der Keimungsprozess von Sporen	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Organismen und Plasmide	10
2.2 Oligonukleotide	11
2.3 Nährmedien	11
2.3.1 Nährmedien für <i>Clostridium acetobutylicum</i>	12
2.3.2 Nährmedium für <i>Escherichia coli</i>	14
2.3.3 Medienzusätze	14
2.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle	15
2.5 Zellanzucht	15
2.5.1 Anaerobe Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i>	15
2.5.1.1 Anzucht in statischer Kultur (Batch-Kultur)	15
2.5.1.2 Anzucht in pH-regulierter statischer Kultur	16
2.5.1.3 Anzucht auf Festmedium	16
2.5.2 Aerobe Zellanzucht von <i>E. coli</i>	16
2.6 Bestimmung physiologischer Parameter	17
2.6.1 Optische Dichte	17
2.6.2 Berechnung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit	17
2.6.3 Bestimmung der Zellzahl	17
2.6.4 Bestimmung der Dezimalreduktionszeit (D-Wert)	18
2.6.5 Messung des pH-Werts	18

2.6.6	Gaschromatographie	18
2.7	Mikroskopische Methoden	18
2.7.1	Lichtmikroskopie	18
2.7.2	Transmissionselektronenmikroskopie	19
2.7.3	Immunelektronenmikroskopie	19
2.8	Isolierung von Nukleinsäuren	20
2.8.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	20
2.8.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	20
2.8.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i> Endosporen	21
2.8.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	22
2.8.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	23
2.9	Molekularbiologische Standardmethoden	23
2.9.1	Reinigung von Nukleinsäuren	23
2.9.1.1	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	23
2.9.2	Agarosegelektrophorese	23
2.9.2.1	Standard-Gelektrophorese	23
2.10	Arbeiten mit Nukleinsäuren	24
2.10.1	Primerdesign	24
2.10.2	PCR-Techniken	24
2.10.2.1	Standard-PCR	24
2.10.2.2	„Splicing by overlap extension“ (SOE)-PCR	24
2.10.2.3	5'-RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends)	25
2.10.2.4	sqRT-PCR (semi-quantitative Reverse Transkriptase-PCR)	25
2.10.3	Enzymatische Modifikation von DNA	25
2.10.3.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen	25
2.10.3.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	26
2.10.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.11	Erzeugung rekombinanter Mikroorganismen	26
2.11.1	DNA-Transfer in <i>E. coli</i>	26
2.11.1.1	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter bzw. elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26

2.11.1.2	CaCl ₂ -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i>	27
2.11.1.3	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	27
2.11.2	DNA-Transfer in <i>C. acetobutylicum</i>	27
2.12	ClosTron® Insertionsmutagenese	28
2.13	Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	28
2.13.1	Sonden-Markierung	28
2.13.2	Übertragung von DNA auf Membranen (Southern Blot)	28
2.13.2.1	Southern Blot - Hybridisierung	29
2.13.2.2	Detektion Digoxigenin-markierter DNA	30
2.14	Arbeiten mit Proteinen	31
2.14.1	Zellaufschluss vegetativer Zellen mittels Ultraschall	31
2.14.2	Zellaufschluss von Endosporen mittels FastPrep	31
2.14.3	Extraktion säurelöslicher Sporenproteinen (SASPs)	31
2.14.4	Dialyse von Proteinen	32
2.14.4.1	Acetylierung von Dialyseschläuchen	32
2.14.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	32
2.14.6	Affinitätschromatographie an <i>Strep</i> -Tactin-Sepharose	33
2.14.7	Ionenaustauschchromatographie	33
2.14.7.1	Anionenaustauscher (DEAE-Cellulose)	33
2.14.7.2	Kationenaustauscher (CM-Cellulose)	34
2.14.8	Polyacrylamidgelektrophorese	34
2.14.8.1	SDS-Gradientengelektrophorese (10-20%)	34
2.14.8.2	Western Blot	34
2.14.8.2.1	Detektion von <i>Strep</i> -tag® II Fusionsproteinen	34
2.14.8.2.2	Doppelimmunpräzipitation und Detektion	35
2.14.9	Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen	35
2.14.10	Protein-Assays	36
2.14.11	Bindungsassay von SASPs und Nukleinsäuren	36
2.14.12	Autoprozessierungs-Assay für GPR und YyaC	36
2.14.13	Substratspezifität von GPR und YyaC	37

2.14.14 Bestimmung der spezifischen Aktivität (SA)	37
2.15 Herstellung eines polyklonalen Anti-SspA-Antikörpers	38
2.15.1 Antikörper-Reinigung mittels Affinitätschromatographie	38
2.16 Arbeiten mit Endosporen	38
2.16.1 Sporenernte	38
2.16.2 Aufreinigung von Sporen	39
2.16.2.1 Dichtegradientenzentrifugation	39
2.16.2.2 Lysozymbehandlung	39
2.16.3 Messung der Dipicolinsäure (DPA)	40
2.16.4 Keimung von Sporen auf Festmedium	40
2.16.4.1 Sporen-Assay	40
2.16.4.2 Behandlung von Sporen mit feuchter Hitze	41
2.16.4.3 Entmantelung von Endosporen	41
2.16.5 Keimung von Sporen in Flüssigmedium	41
2.17 Bezugsquellen	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Identifikation und Zuordnung der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i>	43
3.2 Expression der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i>	45
3.2.1 Vorsporen-spezifische Transkription der <i>ssp</i> Gene von <i>C. acetobutylicum</i>	45
3.2.2 Regulation der SASPs über sporulationsspezifische Sigma-Faktoren	46
3.3 Schutzfunktion von SASPs auf Nukleinsäuren	48
3.3.1 Klonierung der <i>ssp</i> Gene in den pT-Vektor	48
3.3.2 Heterologe Expression der SASPs in <i>E. coli</i>	48
3.3.3 Nukleinsäure-Bindungsstudien	50
3.4 Abbau von SASPs durch Germinationsproteasen	51
3.4.1 Identifikation GPR-ähnlicher Proteasen von <i>C. acetobutylicum</i>	51
3.4.2 Klonierung von <i>cac1275</i> (<i>gpr</i>) und <i>cac2857</i> (<i>yyaC</i>) in den pT-Vektor	53
3.4.3 Expression von Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC) in <i>E. coli</i>	53
3.4.4 Autoprozessierungsreaktion von Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC)	53
3.4.5 Spaltung von SASPs durch Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC)	55

3.5	Erzeugung von SASP-Insertionsmutanten von <i>C. acetobutylicum</i>	57
3.5.1	Wachstum der <i>sspH</i> Mutante	59
3.5.2	Sporenbildung der SASP-Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i>	60
3.5.3	Sporenkeimung der SASP-Mutanten auf Festmedium	61
3.5.4	Sporenkeimung der SASP-Mutanten in Flüssigmedium	63
3.5.5	Dipicolinsäure (DPA) in Endosporen	66
3.6	TEM- und Phasenkontrastmikroskopische Analysen der Sporenkeimung	67
3.7	Untersuchungen zur <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i>	69
3.7.1	Entmantelung von <i>C. acetobutylicum</i> Endosporen	69
3.7.2	Isolierung von DNA aus <i>C. acetobutylicum</i> Endosporen	70
3.7.3	Regulationen der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i> auf Transkriptebene	71
3.7.4	Komplementationsversuche der <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i>	72
3.7.5	Isolierung von SASPs aus <i>C. acetobutylicum</i> Endosporen	74
3.7.6	Nachweis von SASPs mittels Immunelektronenmikroskopie	78
4	Diskussion	80
4.1	<i>Small acid-soluble spore proteins</i> von <i>C. acetobutylicum</i>	81
4.2	DNA-Bindung der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i>	82
4.3	Das Protein Tlp (Cac1487)	82
4.4	Zeitliche Expression der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i>	84
4.5	Funktion der SASPs in <i>C. acetobutylicum</i> Endosporen	84
4.6	Die <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i>	87
4.6.1	Gehalt an Dipicolinsäure in <i>C. acetobutylicum</i> Endosporen	87
4.6.2	Analysen zum Sporenmantel und zur DNA in Endosporen	87
4.6.3	Regulation der SASPs auf Transkript- und Proteinebene	89
4.6.4	Komplementationsversuche der <i>sspA</i> Mutante	90
4.6.5	SspA in <i>C. acetobutylicum</i> Endosporen	91
4.7	Germinations-spezifische Proteasen von <i>C. acetobutylicum</i>	92
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis	101
7	Anhang	115

Danksagung.....	124
Selbständigkeitserklärung.....	126

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere, Adenin
A.	<i>Aqua, Arabidopsis</i>
Ä	Ähnlichkeit
Abb.	Abbildung
ABE	Aceton, Butanol und Ethanol
ad	auffüllen auf
α	Alpha
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	,American Type Culture Collection'
B.	<i>Bacillus</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration, copy, centi
C	Kohlenstoff, Cytosin
C-	Carboxy-
C.	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CAC	, <i>C. acetobutylicum</i> Chromosome‘ (Chromosom)
CatP	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cfu	,Colony Forming Units‘
Cm	Chloramphenicol
CM	Carboxymethyl
Co	,Core‘
CO ₂	Kohlendioxid
Ct	,Coat‘, Sporangium
Cx	Cortex
d	Schichtdicke, Desoxy

D	Aspartat
D_x	D-Wert, dezimale Reduktionszahl
Da	Dalton
<i>dest.</i>	destilliert
DEAE	Diethylaminoethyl
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DPA	Dipicolinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
E.	<i>Escherichia</i>
EBS	,Exon Binding Site'
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
Ery	Erythromycin
et al.	,et alteri' (und andere)
FPLC	,Fast Protein Liquid'-Chromatographie
fw	forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GPR	Germinationsprotease
h	Stunde
H_2	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
HTH	Helix-Turn-Helix
HydA	Hydrogenase
I	Identität
IBS	,Intron Binding Site'
k	kilo
KOH	Kaliumhydroxid
L.	<i>Lactococcus</i>

l	Liter, Länge
LB	Luria-Bertani
log	dekadischer Logarithmus
ln	natürlicher Logarithmus
μ	mikro (10^{-6})
m	Meter, milli (10^{-3})
M	Molar, Marker
MALDI-TOF	,Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight‘
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mind.	mindestens
mod.	modifiziert
mRNA	messanger RNA
MW	Molekulargewicht
N-	Amino-
n	nano (10^{-9})
N	Normal, Adenin oder Cytosin oder Thymin oder Guanin
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	,Open Reading Frame‘
P	Phosphat
PABA	Paraaminobenzoësäure
PBS	,Phosphate Buffered Saline‘
PCR	,Polymerase Chain Reaction‘
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isolelektrischer Punkt
R	Adenin oder Guanin
RACE	,Rapid Amplification of cDNA Ends
RBS	Ribosomenbindestelle
RCA	,Reinforced Clostridial Agar‘
rev	reverse
RNase	Ribonuklease

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	,Reverse Transcription‘-PCR
s	Sekunde
SA	Spezifische Aktivität
SAP	,Shrimp Alkalische Phosphatase‘
SASP	,Small Acid-Soluble spore‘-Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
σ	Sigma
SOE	,Splicing by Overlap Extension‘
sq	semi-quantitativ
ssp	,small spore protein‘-Gen
TT	Turn
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Aacetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetracyclin
Tlp	,Thioredoxin-like‘-Protein
Tm	Thiamphenicol
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
Trx	Thioredoxin
TSP	Transkriptionsstartpunkt
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt, Volumen
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
vZ	vegetative Zelle
W	Watt, Adenin oder Thymin
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
Y	Cytosin oder Thymin

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Morphologische Stadien der Sporulation	3
Abb. 1.2:	Regulatorische Sporulationskaskade in <i>C. acetobutylicum</i>	4
Abb. 1.3:	Schematischer Aufbau einer Endospore	6
Abb. 1.4:	Bindung von SASPs an die DNA und deren Konformationsänderung in eine A-B-Form	7
Abb. 1.5:	Schematische Übersicht zur Keimung von <i>C. perfringens</i> Sporen	8
Abb. 1.6:	Bildung und Regulation der Germinationsprotease (GPR) im Sporenkern	9
Abb. 3.1:	Alignment der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i> gegen SspA von <i>B. subtilis</i>	44
Abb. 3.2:	Spezifische mRNA Transkripte der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i> während der frühen Sporulation	45
Abb. 3.3:	Darstellung des chromosomalen DNA-Lokus von <i>sspA</i> in <i>C. acetobutylicum</i>	46
Abb. 3.4:	Promotor- und Terminatorregionen der <i>ssp</i> Gene von <i>C. acetobutylicum</i>	47
Abb. 3.5:	Rekombinante SASPs von <i>C. acetobutylicum</i>	49
Abb. 3.6:	Nukleinsäure-Bindestudien der rekombinanten SASPs von <i>C. acetobutylicum</i>	50
Abb. 3.7:	Alignment von GPR und YyaC-Proteasen aus <i>C. acetobutylicum</i> und <i>B. megaterium</i>	52
Abb. 3.8:	N-terminale Aktivierungssequenzen bei GPR und mögliche Sequenzen bei YyaC	54
Abb. 3.9:	Autoprozessierung von Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC) von <i>C. acetobutylicum</i>	54
Abb. 3.10:	Proteolytische Spaltung rekombinanter SASPs, sowie Spezifitäten der GPR und YyaC von <i>C. acetobutylicum</i>	56
Abb. 3.11:	Nachweis der Integration des Gruppe II Introns in das <i>sspH</i> -Gen mittels PCR	59
Abb. 3.12:	Verifikation der <i>sspH</i> -Insertionsmutante durch Southern Hybridisierung	59
Abb. 3.13:	Wachstumsanalyse und Fermentationsprodukte der <i>sspH</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i> im Vergleich zum Wildtypstamm	60
Abb. 3.14:	Bildung freier Sporen bei den SASP-Mutanten und beim Wildtyp von <i>C. acetobutylicum</i> über 120 h	61

Abb. 3.15:	Hitzeresistenz von Sporen der SASP-Mutanten und des Wildtyps von <i>C. acetobutylicum</i> bei 80 °C	62
Abb. 3.16:	Keimungsanalysen von Sporen der SASP-Mutanten und des Wildtyps von <i>C. acetobutylicum</i> in Komplexmedium	64
Abb. 3.17:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Sporen des Wildtyps und der SASP-Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i>	67
Abb. 3.18:	Phasenkontrastmikroskopische Analysen zur Auskeimung von Sporen des Wildtyps und der <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i>	68
Abb. 3.19:	Koloniebildung entmantelter Sporen des Wildtyps und der <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i>	70
Abb. 3.20:	PCR-Amplifikationen zur Überprüfung der Intaktheit von DNA aus Wildtyp- und aus <i>sspA</i> ::int-Sporen von <i>C. acetobutylicum</i>	71
Abb. 3.21:	Vergleichende sqRT-PCR von <i>ssp</i> Gentranskripten im <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp und in der <i>sspA</i> Mutante	72
Abb. 3.22:	Ionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von Sporenproteinen des Wildtyps und der <i>sspA</i> Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i> über DEAE- und CM-Cellulose-Säulen	75
Abb. 3.23:	Isolierte Sporenproteine des Wildtyps und der <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i>	76
Abb. 3.24:	Antigennachweise von SASPs in <i>C. acetobutylicum</i> Sporen des Wildtyps und <i>sspA</i> Mutante mittels <i>postembedding-immunogold</i> -Markierung	79
Abb. 4.1:	Expressionsprofil von Genen unter Kontrolle von σ^G in <i>C. acetobutylicum</i>	84
Abb. 4.2:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Sporen des Wildtyps und der $\alpha\beta\gamma$ Mutante von <i>B. subtilis</i>	92
Abb. 4.3:	Zeitabhängige molekulare Wiedererweckung einer bakteriellen Spore	93
Abb. 4.4:	Expressionsprofil von Genen in <i>C. acetobutylicum</i> , die mit der Keimung assoziiert sind	95
Abb. 4.5:	Alignment von GPR und YyaC, sowie entfernt ähnlicher Proteine bei Vertretern ausgewählter Bacilli (Bac) und Clostridien (Clost)	96
Abb. 7.1:	Sporenproteine des Wildtyps und der <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i>	117
Abb. 7.2:	Chromosomaler DNA-Lokus von <i>sspF</i> (A) und <i>tlp</i> (B) in <i>C. acetobutylicum</i>	118
Abb. 7.3:	Vorsporen-spezifische Sigma-Faktoren der <i>ssp</i> -Gene von <i>C. acetobutylicum</i> und der <i>ssp</i> Gene von <i>B. subtilis</i>	119
Abb. 7.4:	Aminosäurezusammensetzungen der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i>	119

Abb. 7.5:	Verifikation von <i>ssp</i> - (A), <i>gpr</i> - und <i>yycA</i> - (B) Gen-tragenden rekombinanten pT- Plasmiden	120
Abb. 7.6:	Verifikation von Komplementation-Plasmiden	120
Abb. 7.7:	Schutzfunktion von <i>C. acetobutylicum</i> Gesamtsporenprotein auf Plasmid-DNA	120
Abb. 7.8:	Oligomerisierung bei dem rekombinant aus <i>E. coli</i> (A) und dem rekombinant aus <i>C. acetobutylicum</i> (B) gewonnenen Protein Tlp (Cac1487)	121
Abb. 7.9:	Zeitabhängige Aktivierung der rekombinanten Proteasen GPR (A) und YyaC (B) von <i>C. acetobutylicum</i> in Autoprozessierungs-Puffer	121
Abb. 7.10:	Sequenzvergleiche des N-Terminus putativer YyaC-Proteasen ausgewählter <i>Clostridium</i> und <i>Bacillus</i> Vertreter	121
Abb. 7.11:	Keimungsanalyse von Sporen des Wildtyps und der <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i> nach einer Lagerung von 21 Tagen auf RCA-Festmedium	122
Abb. 7.12:	Schematische Darstellung des pT-catP-Vektors	122
Abb. 7.13:	Plasmidkarte von pMTL007C-E2	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Organismen	10
Tab. 2.2:	Rekombinante Plasmide	11
Tab. 2.3:	Medienzusätze	14
Tab. 2.4:	Verwendete Restriktionsendonukleasen	26
Tab. 2.5:	Bezugsquellen	42
Tab. 3.1:	SASPs von <i>C. acetobutylicum</i>	43
Tab. 3.2:	GPR-ähnliche Proteasen von <i>C. acetobutylicum</i>	52
Tab. 3.3:	Substratspezifitäten der GPR und YyaC von <i>C. acetobutylicum</i>	57
Tab. 3.4:	Resistenzen von Sporen der SASP-Mutanten und des <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyps bei 80 °C	62
Tab. 3.5:	Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der SASP-Mutanten und des Wildtyps von <i>C. acetobutylicum</i> aus Sporen in 10-ml-CGM-Kulturen nach unterschiedlichen Behandlungen	65
Tab. 3.6:	Dipicolinsäuregehalt in SASP-Mutanten- und Wildtyp-Sporen von <i>C. acetobutylicum</i>	66
Tab. 3.7:	Plasmid-gestützte Komplementation der <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i> mit unterschiedlichen <i>ssp</i> Promotor/ <i>ssp</i> Gen-Kombinationen	73
Tab. 3.8:	SASP-Antigene in Sporen des Wildtyps und der <i>sspA</i> Mutante von <i>C. acetobutylicum</i> unter Verwendung des polyklonalen Anti-SspA-Antikörpers	78
Tab. 7.1:	Oligonukleotide	115
Tab. 7.2:	Vektoren	116
Tab. 7.3:	Identitäten der SASPs von <i>C. acetobutylicum</i> zueinander und zu SASPs von <i>B. subtilis</i> und <i>C. perfringens</i>	116
Tab. 7.4:	MALDI-TOF MS identifizierte Proteine des Wildtyps und der <i>sspA</i> -Mutante von <i>C. acetobutylicum</i>	116

1 Einleitung

Obwohl es sich bei den Clostridien um die ältesten Vertreter sporenbildender Bakterien handelt, wird an ihren Überlebensstrategien und der Sporenentwicklung erst seit den letzten Jahren intensiver geforscht (Al-Hinai *et al.*, 2014, 2015). Lange Zeit galt *Bacillus subtilis* als Modellorganismus für die Aufklärung und Untersuchung der Sporulation, doch neuste Erkenntnisse zeigen, dass der Sporulationprozess bei Clostridien wesentliche Unterschiede im Vergleich zu *Bacillus* aufweist. So sind einige Sporulationsgene nicht vorhanden und sowohl die Initiation, Regulation, als auch einige Synthesewege der Sporulation anders instrumentalisiert als bei den Bacilli. Aufgrund dieser Unterschiede können verschiedene Ausprägungen von Phänotypen und somit neue Anpassungs- und Verbreitungsstrategien geschaffen werden (Al-Hinai *et al.*, 2015; McKenney *et al.*, 2013).

Im Hinblick auf kleine säurelösliche Sporenproteine (SASPs), die eine wichtige Funktion für die Resistenz und Keimungsfähigkeit von Sporen erfüllen, sind die meisten Untersuchungen bisher weitestgehend auf *Bacillus* beschränkt und für Clostridien nur wenig erforscht. Dabei können die Sporenproteine aufgrund ihrer Funktion von Interesse bei der Bekämpfung humanpathogener Clostridien, wie *C. difficile* und *C. tetani* oder Lebensmittelverderberen wie *C. butyricum* und *C. estertheticum* sein. In Bezug auf biotechnologisch und industriell genutzte Stämme, wie *C. acetobutylicum* oder *C. propionicum*, wäre eine Funktionsaufklärung der Sporenproteine sowohl für deren Lagerung, aber auch für eine Optimierung der Sterilisationsbedingungen nach den Kulturführungen von Vorteil.

1.1 Zielstellung

Clostridium acetobutylicum gilt als Modellorganismus für die Aufklärung der clostridiellen Sporulation (Al-Hinai *et al.*, 2015). Dennoch ist über seine „*Small acid-soluble spore*“-Proteine (SASPs) bisher nichts bekannt. Lediglich im Rahmen von Transkriptom-Untersuchungen der *C. acetobutylicum* Sporulation wurden einige Gene der SASPs erfasst (Jones *et al.*, 2008). Daher sollte im Zuge dieser Arbeit geklärt werden, welche SASPs *C. acetobutylicum* zur Verfügung stehen und welche spezifischen Funktionen sie in den Sporen erfüllen. In die Untersuchungen wurden zwei Germinationsproteasen von *C. acetobutylicum* eingeschlossen. Dazu zählte auch, inwieweit die SASPs von den mutmaßlichen Germinationsproteasen GPR und YyaC spezifisch gespalten werden können.

Zur Einführung in die theoretischen Hintergründe wird nachfolgend neben dem Prozess der Sporulation (1.2), die Funktion von SASPs für die Resistenz (1.3) und die Keimungsfähigkeit von Sporen (1.4) genauer erläutert und ebenso die Funktion von Germinationsproteasen näher beleuchtet (1.4), stets mit aktuellem Bezug auf Clostridien.

1.2 Der Sporulationsprozess

Die Sporulation ist einer der wichtigsten Prozesse um das Überleben von Bakterien unter unvorteilhaften und feindlichen Umweltbedingungen wie Nährstoffmangel oder chemischen bzw. physikalischen Stressoren zu sichern. Die dabei gebildeten Endosporen schützen das Erbgut der Zellen und gelten als die wahrscheinlich resistenteste Lebensform auf der Erde, die bis zu Millionen von Jahren überdauern kann (Nicholson *et al.*, 2000; Vreeland *et al.*, 2000). Zur Sporenbildung sind Vertreter der Gattungen *Clostridium* und *Bacillus* befähigt, die beide zu den *Firmicutes* gehören und bereits vor ~2,7 Milliarden Jahren (Clostridia) bzw. ~2,3 Milliarden Jahren (Bacilli) als separate Klassen auftraten (Paredes *et al.*, 2005).

Bei den Clostridia handelt es sich um eine heterogene taxonomische Gruppe mit stäbchenförmiger Morphologie, Gram-positiver Zellwand und einem anaeroben Metabolismus, die Endosporen ausbilden, aber zu einer dissimilatorischen Sulfat-Reduktion nicht befähigt sind (Dürre, 2005). Diese Gattung beherbergt viele verschiedene Spezies, wie humane Microbiota (*C. leptum*, *C. coccoides*), acetogene Bakterien (*C. ljungdahlii*, *C. carboxidivorans*), Lösungsmittelbildner (*C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*), aber auch Krankheitserreger wie *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* und *C. tetani* (Al-Hinai *et al.*, 2015).

C. acetobutylicum ist durch seine industriell nutzbare ABE-(Aceton-Butanol-Ethanol)-Fermentation historisch und auch heute wieder von großem Interesse (Bahl *et al.*, 1982; Millat *et al.*, 2013). Aufgrund seiner Genomsequenzierung (Nölling *et al.*, 2001) und zahlreicher Studien dient er zudem als Modellorganismus der clostridiellen Sporulation (Al-Hinai *et al.*, 2015). Im Zuge des exponentiellen Wachstums produziert *C. acetobutylicum* beträchtliche Mengen an den Gärungsprodukten Acetat und Butyrat, wodurch der pH-Wert im Medium auf ca. 4,7 absinkt. Bei diesem drastisch niedrigen pH-Wert liegen die Säuren Acetat und Butyrat aufgrund ihrer pK_S-Werte in einem undissoziierten Zustand im Medium vor und können so ungehindert zurück in die Zelle diffundieren. Aufgrund des um eine pH-Stufe erhöhten zytosolischen pH-Werts, dissoziieren die Säuren dort erneut und heben den lebensnotwendigen transmembranen Protonengradienten der Zelle auf.

Um dem zu entgehen, leitet *C. acetobutylicum* die Lösungsmittelbildung ein, in der die Säuren teilweise zu Aceton und Butanol umgesetzt werden. Die Produktion der Lösungsmittel verschafft der Zelle zusätzliche Zeit, die Sporenbildung zu vollziehen, bevor diese selbst für die Zellen irgendwann toxisch werden (<2 %) (Dürre, 2014). Der ablaufende Sporulationsprozess kann dabei allgemein in insgesamt acht Stadien (0-VII) unterteilt werden (Abb. 1.1).

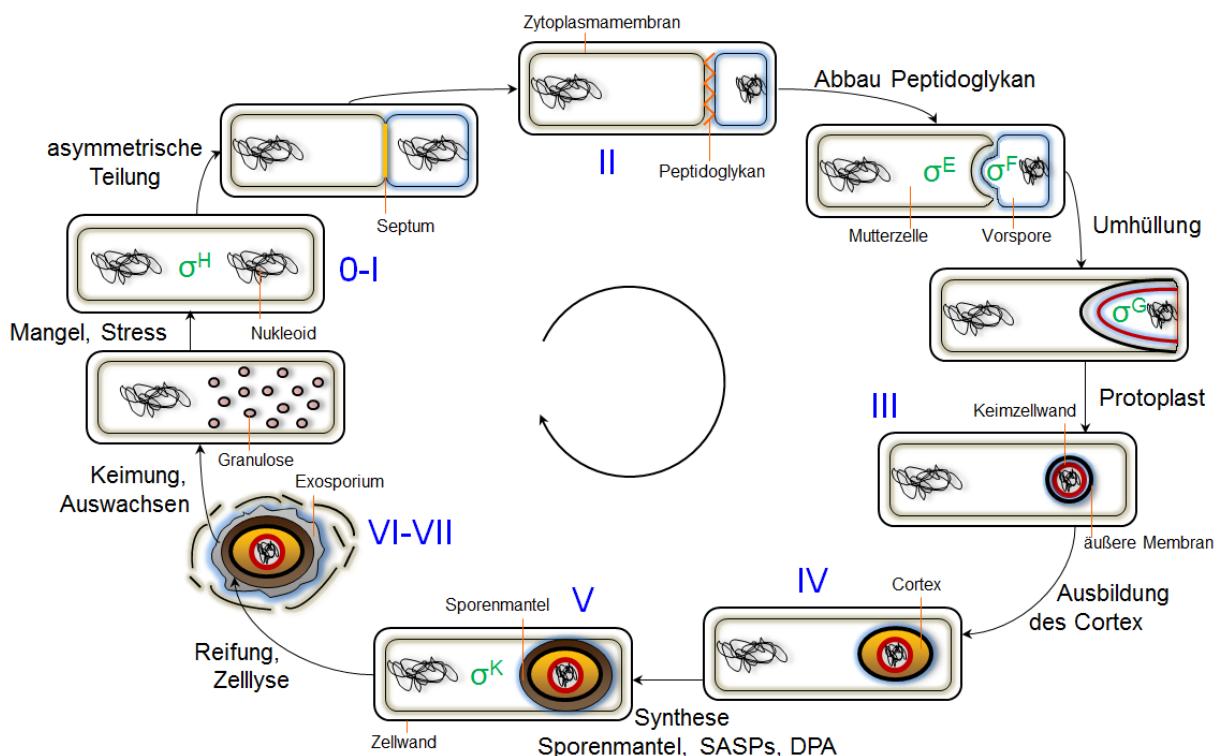


Abb. 1.1: **Morphologische Stadien der Sporulation** (Stragier & Losick, 1996; mod.). Die verschiedenen Stadien sind durch römische Zahlen (0-VII) gekennzeichnet und sporespezifische Sigma-Faktoren (σ^H , σ^E , σ^F , σ^G , σ^K) dort angegeben, wo sie aktiviert werden. „Clostridial-stage“-Zellen mit Vesikeln akkumulierter Granulose sind nur bei Clostridien vorzufinden (Dürre, 2014).

Nach Initiation der Sporulation entstehen zunächst durch eine asymmetrische Teilung der Zelle (Stadien 0-I, Abb. 1.1) zwei unterschiedlich große Kompartimente, die als Mutterzelle und Vorspore bezeichnet werden (Stadium II). Im Laufe der weiteren Entwicklung kommt es zu einer Umhüllung der Vorspore durch die Mutterzelle, wodurch ein Protoplast in der Zelle entsteht, der zunächst aus zwei Schichten, einer inneren Keimzellwand und einer äußeren Membran besteht (Stadium III). Zwischen diesen beiden Schichten bildet sich eine dicke Rinde aus (Cortex, Stadium IV) und im darauffolgenden Stadium V der Sporulation kommt es zur Synthese eines Sporenmantels, der den Cortex umhüllt. Nach einer weiteren Reifung der Spore, wird diese letztendlich durch eine Lyse der Mutterzelle in das umgebende Medium

freigesetzt (Stadien VI-VII, Abb. 1.1) und kann dort die lebensfeindlichen Bedingungen überdauern. Unter erneut günstigen Wachstumsbedingungen ist die Spore in der Lage zu einer neuen Zelle auszuwachsen und somit einen neuen Generationszyklus zu ermöglichen (Al-Hinai *et al.*, 2015).

Die Entwicklung der Sporen wird dabei sowohl zeitlich, als auch hierarchisch durch sporespezifische Sigma-Faktoren reguliert (Abb. 1.2). Der Sigma-Faktor σ^H ist der erste von fünf Transkriptionsaktivatoren, der positiv den Masterregulator der Sporulation Spo0A reguliert. In *C. acetobutylicum* wird Spo0A dabei direkt über drei Histidin-Kinasen aktiviert (Abb. 1.2) (Al-Hinai *et al.*, 2015) und führt zur Expression eines tricistronischen *spoIIA* Operons, welches Gene für den Vorsporen-spezifischen Sigma-Faktor σ^F kodiert. Nach Aktivierung von σ^F kommt es zur Expression einer inaktiven Vorstufe von σ^E in der Mutterzelle, deren Reifung durch eine membrangebundene Protease SpoIIGA ermöglicht wird (Al-Hinai *et al.*, 2015). Dabei gewährleistet σ^F auch die Expression von σ^G in der Vorspore (Abb. 1.2), welcher als Transkriptionsaktivator die Protease SpoIVFB reguliert (Al-Hinai *et al.*, 2014), die letztendlich für die Reifung von pro- σ^K zu σ^K in der Mutterzelle verantwortlich ist. In *C. acetobutylicum* nimmt dabei der Sigma-Faktor σ^K eine duale Rolle sowohl bei der Initiation der Sporulation, als auch bei der späteren Sporenentwicklung ein (Stadium I und IV; Abb. 1.2) (Al-Hinai *et al.*, 2015).

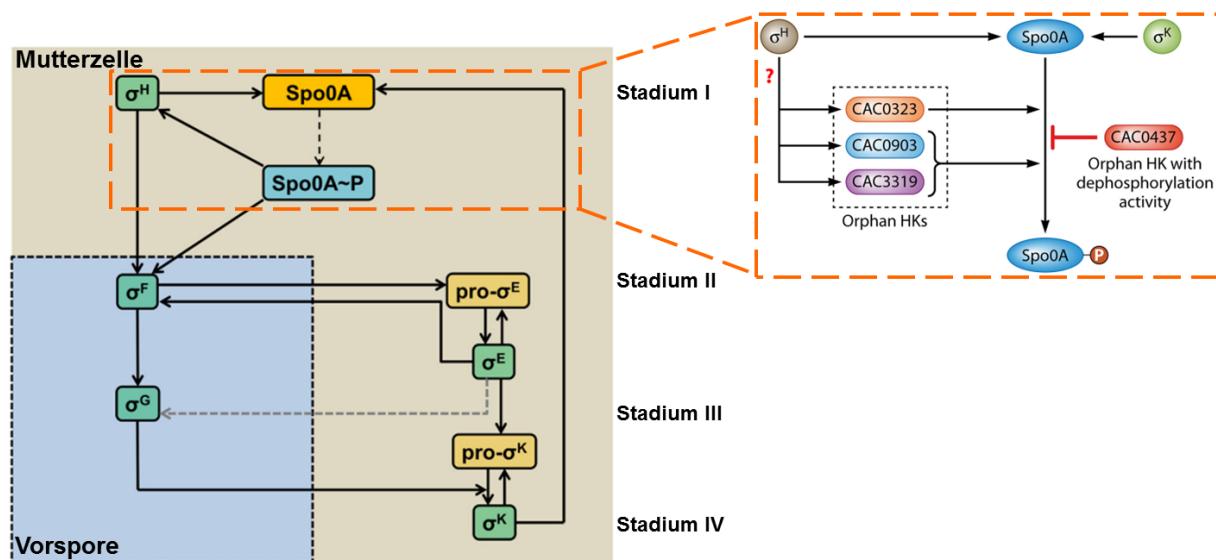


Abb. 1.2: **Regulatorische Sporulationskaskade in *C. acetobutylicum*** (Al-Hinai *et al.*, 2014; 2015; mod.). Die Kompartimente von Mutterzelle und Vorspore sind in Braun und Blau dargestellt. Gestrichelte Linien deuten eine mögliche Interaktion zwischen den Sigma-Faktoren σ^E und σ^G an. In dem orange dargestellten Bereich wird der Masterregulator Spo0A durch Phosphorylierung über drei Histidin-Kinasen von *C. acetobutylicum* (HK; Cac0323, Cac0903, Cac3319) aktiviert. Als deren Antagonist spielt Cac0437 eine Rolle.

1.3 Die Resistenz von Endosporen

Die Überdauerung von Sporen unter unwirtlichen Bedingungen wird maßgeblich durch ihren strukturellen Aufbau, den geringen Wassergehalt im Sporenkern mit hohem Anteil an Dipicolinsäure, als auch durch die Schutzfunktion der „*Small acid-soluble spore proteins*“ (SASPs) gewährleistet (Abb. 1.3) (Setlow, 2007). Die äußere Schutzhülle bildet der Sporenmantel, der mehrschichtig aufgebaut ist (McKenney *et al.*, 2013) und wie ein Filter wirkt (Abel-Santos, 2012), indem er den darunterliegenden Cortex vor enzymatischem Abbau schützt (Henriques & Moran, 2007) und Resistenz gegen H₂O₂ (Checinska *et al.*, 2012) und UV-Strahlung bietet (Riesenman & Nicholson, 2000). Der Cortex besteht im Vergleich zu vegetativen Zellen aus modifiziertem Peptidoglykan (Popham, 2002) und ist verantwortlich für die Hitzeresistenz und die Aufrechterhaltung des geringen Wassergehalts des Protoplasten (Colas de la Noue *et al.*, 2015). Dabei liegt der Wasseranteil in Sporenmantel und Cortex bei ca. 75 - 80 %, wohingegen der Wassergehalt des Sporenkerns nur ca. 28 - 50 % beträgt (Nicholson *et al.*, 2000). Die den Sporenkern umgebende innere Membran ist demzufolge nur geringfügig permeabel und liegt in einer Art Gelphase vor (Colas de la Noue *et al.*, 2015). Sie beherbergt Germinationsrezeptoren, die für die Nährstoff-induzierte Keimung der Sporen verantwortlich sind (Abb. 1.5) (Setlow, 2013). Auch der Sporenkern kann als eine Art hitzestabiles Gel angesehen werden (Abel-Santos, 2012), indem der Wassergehalt so gering ist, dass die dort befindlichen Proteine von nur maximal einer Hydrathülle umgeben sind (Colas de la Noue *et al.*, 2015; Sunde *et al.*, 2009).

Im Sporenkern befinden sich weitere Komponenten, die eine wichtige Funktion für die Resistenz von Endosporen erfüllen. Die Dipicolinsäure (Pyridin-2,6-Dicarbonsäure, DPA) wird in der Mutterzelle als ein Sekundärmetabolit des Lysin-Biosyntheseweges synthetisiert, deren Aufnahme in das Vorsporen-Kompartiment durch ein SpoVAD Protein ermöglicht wird (Orsburn *et al.*, 2010). Im Sporenkern akkumuliert DPA zu einem 1:1 Chelat mit zweiwertigen Ca²⁺-Ionen, (Abb. 1.3, A) und liegt mit 10 - 15 % des Trockengewichts weit über seiner eigentlichen Löslichkeit vor (Colas de la Noue *et al.*, 2015). Die Dipicolinsäure ist in der Lage in die genomische DNA zu interkalieren und durch seine direkte Nähe als Photosensibilisator der DNA zu wirken (Lindsay & Murrell, 1986; Douki *et al.*, 2005). Zudem hat sie einen entscheidenden Einfluss auf die Verdrängung des Wassers im Sporenkern und somit auf die Resistenz und Stabilität der Spore gegen Hitze, Austrocknung, Strahlung und Chemikalien (Kong *et al.*, 2012). Die eigentliche Schutzfunktion übernehmen unspezifische DNA-

Bindoproteine (*small acid-soluble spore proteins*, SASPs), die in hohen Mengen im Sporenkern vorliegen und die genomische DNA dabei vollständig vor äußeren Umweltfaktoren, wie UV-Strahlung und Hitze, aber auch vor Depurinierung oder oxidativen Läsionen schützen (Abb. 1.3, B) (Fairhead *et al.*, 1993; Moeller *et al.*, 2008).

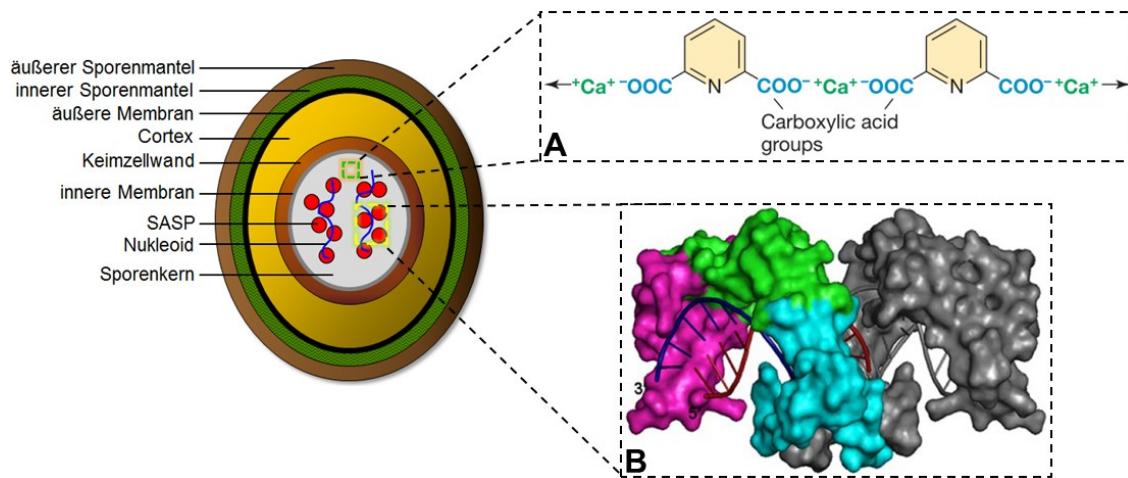


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau einer Endospore. (McKenney *et al.*, 2013; mod.). (A) Chelatkomplex aus Dipicolinsäure und zweiwertigen Ionen (Ca^{2+}) im Kern von Endosporen (Madigan *et al.*, 2010). (B) α/β -Typ-SASP-DNA-Komplex aus drei SASP-Molekülen (Magenta, Grün, Cyan) und einer 10-Bp-DNA (3'/5'). Moleküle in Grau stellen den nächsten SASP-DNA-Komplex dar, der sich weiter entlang der kleinen Furche der DNA windet (Lee *et al.*, 2008).

Bei den SASPs handelt es sich um eine Klasse hochkonservierter Proteine, welche ausschließlich in Sporen vorzufinden sind (Setlow, 1988). Sie werden erst in der späteren Sporenentwicklung (Abb. 1.1) noch vor der Synthese von Dipicolinsäure gebildet und unterliegen der Kontrolle des sporenspezifischen Sigma-Faktors σ^G (Setlow, 1988). Je nach Eigenschaften und Konservierung können sie in zwei Familien eingeteilt werden, die α/β -Typ SASPs und die γ -Typ SASPs (Setlow, 2007). Die α/β -Typ SASPs werden von multiplen Genen kodiert und sind aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung in der Lage DNA unspezifisch zu binden (Lee *et al.*, 2008). Dabei sind die Aminosäurereste sowohl innerhalb, als auch zwischen *Clostridium* und *Bacillus* konserviert (Setlow, 1988). Die Familie der γ -Typ SASPs ist alleinig auf die Gattung *Bacillus* beschränkt und wird durch nur ein *sspE*-Gen kodiert (Vyas *et al.*, 2011). Die Aminosäuren zeigen keine hohen Übereinstimmungen zu α/β -Typ SASPs und die Proteine sind nicht in der Lage DNA zu binden (Setlow *et al.*, 1992), weshalb sie frei im Zytosplasma vorliegen (Cucchi & Sanchez de Rivas, 1998).

In Clostridien sind nach dem derzeitigen Kenntnisstand nur α/β -Typ SASPs vertreten (Vyas *et al.*, 2011), die entsprechend ihres Auftretens in den Sporen in Major (Haupt)- oder Minor

(Neben)-SASPs kategorisiert werden (Setlow, 1988). Die Art der Bindung der SASPs an die DNA ist dabei einzigartig. In Abwesenheit von DNA weisen SASPs keine Sekundärstruktur auf und werden nur α -helikal in Gegenwart doppelsträngiger DNA (Abb. 1.4, A). Deren Bindung wird durch ein Helix-Turn-Helix ähnliches Motiv ermöglicht, indem Helix 1 auf dem Rand der kleinen Furche und Helix 2 desselben SASP-Moleküls direkt in der kleinen Furche der DNA liegt (Abb. 1.4, A). Die Bindung der SASPs folgt dabei der Richtung der DNA, infolgedessen es zu deren Konformationsänderung von der B-Form in eine A-B-Form kommt (Abb. 1.4, B). Die SASPs selbst sind dabei zu ~65 % α -helikal angeordnet (Lee *et al.*, 2008).

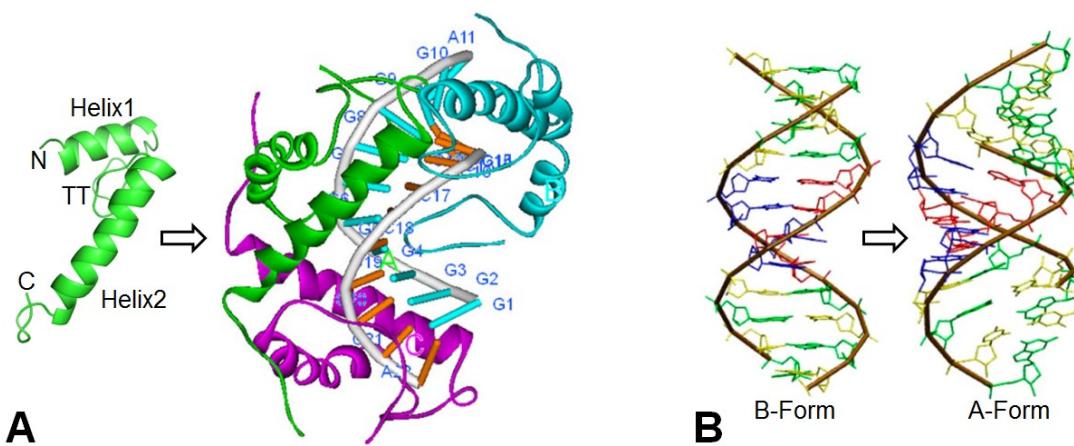


Abb. 1.4: Bindung von SASPs an die DNA und deren Konformationsänderung in eine A-B-Form. (A) Modellkomplex der Bindung von drei SASP-Molekülen (Magenta, Grün, Cyan) entlang der kleinen Furche einer 10-Bp-DNA-Doppelhelix. Ein SASP-Molekül besteht aus Helix 1, Turn-Region (TT) und Helix 2 (Ge *et al.*, 2011; mod.). (B) Konformationen der DNA in einer B-Form und einer A-Form (Knee *et al.*, 2008; mod.).

Ein SASP-DNA-Komplex besteht aus insgesamt drei SASP-Molekülen und einem 10-Bp-DNA-Abschnitt (Abb. 1.4, A; Abb. 1.3,B), indem zwei SASP-Moleküle als Dimer ca. sechs Basenpaare der DNA binden (Magenta & Grün, Abb. 1.4, A; Abb. 1.3, B), derweil ein drittes SASP-Molekül eine dimere Anordnung mit einem vierten SASP-Molekül eingeht (Cyan & Grau, siehe Abb. 1.3, B) (Lee *et al.*, 2008). Diese Anordnung erfolgt so lange bis die genomische DNA komplett abgedeckt ist, weshalb in Endosporen eine sehr hohe Anzahl an SASP-Molekülen vertreten ist (Setlow, 1995). Die hauptsächlichen Bindungsenergien in diesem Komplex sind nicht-kovalente Van-der-Waals-Kräfte (Ge *et al.*, 2011). Diese moderaten Bindungen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den SASPs mit den Basenpaaren der DNA und durch hydrophobe Interaktionen der SASPs untereinander begünstigt (Ge *et al.*, 2011). Für die Schutzfunktion der DNA ist der Helix 2 mit den Aminosäureresten Ser⁻³⁴, Gly⁻³⁸, Gly⁻⁴¹ und Thr⁻⁴⁵ verantwortlich, welche die Base Guanin in

der kleinen Furche abdecken (Lee *et al.*, 2008). Die zusätzliche dichte Packung der Proteine wird durch hydrophobe Interaktionen zwischen den Aminosäuren Ile-¹³, Met-¹⁶, Ile-²⁰ und Phe-²⁴ von Helix 1 und Val-⁴⁰, Ile-⁴⁴ und Leu-⁴⁸ von Helix 2 ermöglicht (Lee *et al.*, 2008).

Die veränderte A-B-Konformation der DNA ermöglicht zudem die Ausbildung eines einzigartigen Sporenphotoproducts (SP), welches sich zwischen zwei benachbarten Thymin-Basen in der DNA-Helix ausbilden kann und nach UV-Schädigung effizient durch ein SP-Lyase System repariert wird (Silver *et al.*, 2010).

1.4 Der Keimungsprozess von Sporen

Die ruhende Spore ist aufgrund des geringen Wassergehalts im Kern metabolisch inaktiv, aber in der Lage auf wachstumsbegünstigende Umweltbedingungen zu reagieren (Setlow, 2003). Auslöser der nicht-Rezeptor-vermittelten Keimung können dabei Peptidoglykan-Fragmente, Lysozym oder DPA-Chelatkomplexe, aber auch die physikalische Einwirkungen von Druck sein (Setlow, 2013). Die Rezeptor-vermittelte Keimung erfolgt über Germinationsrezeptoren in der inneren Membran der Spore (Abb. 1.5), die spezifisch durch Aminosäuren, Zucker, Purin-Nukleoside oder monovalente Kationen (K^+) aktiviert werden (Setlow, 2013).

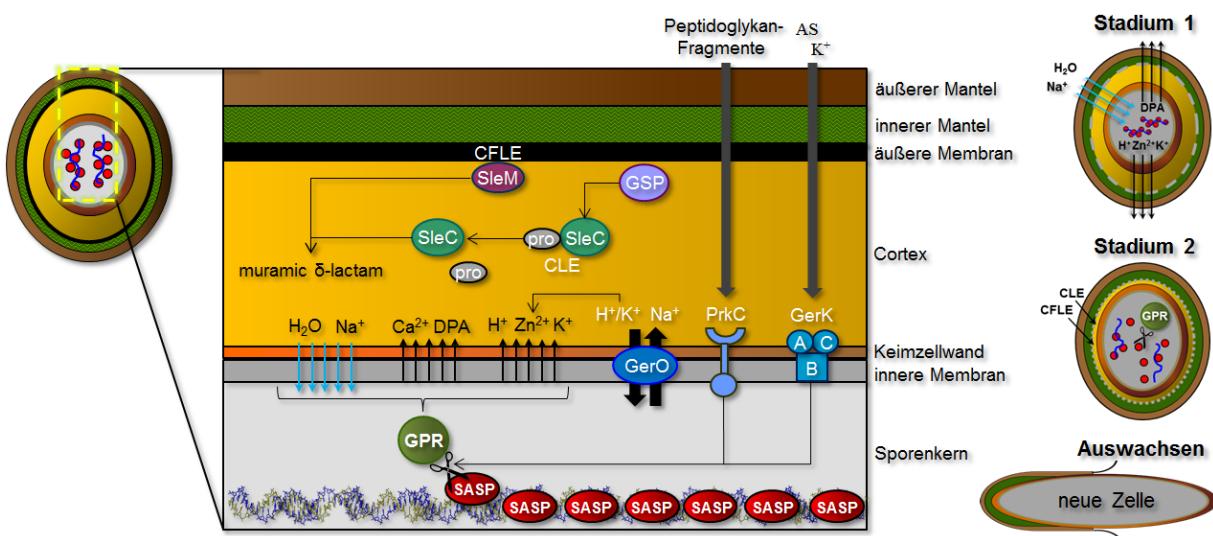


Abb. 1.5: Schematische Übersicht zur Keimung von *C. perfringens* Sporen (Xiao *et al.*, 2011; mod.). PrkC: Peptidoglykan-vermittelte Keimung; GerK: Germinationsrezeptor für Aminosäuren und K^+ ; GerO: Antiporter; CLE: Cortex-lytisches Enzym (SleC); CFLE: Cortex-Fragment-lytisches Enzym (SleM); GSP: Protease zur Aktivierung von SleC; GPR: Germinationsprotease; SASP: Small acid-soluble spore protein.

Durch Rezeptor- bzw. nicht-Rezeptor-vermittelte Aktivierung kommt es zu einer Freisetzung von Ionen aus dem Sporenkern, infolgedessen der pH-Wert des Kerns auf ca. 8 ansteigt

(Setlow, 2013). Kurze Zeit später wird auch das große Depot an Dipicolinsäure aus dem Kern entlassen und durch Wasser ersetzt, wodurch das erste Stadium der Keimung beendet ist (Abb. 1.5) (Setlow, 2003). Das zweite Stadium der Keimung ist gekennzeichnet durch eine Hydrolyse des Peptidoglykans im Cortex durch Cortex-lytische Enzyme (CLE, CFLE, Abb. 1.5). Eine weitere Wasseraufnahme führt zu einer Ausdehnung des Sporenkerns bis ein Wassergehalt von ca. 80 % vorliegt (Setlow, 2013). Da die Affinität der SASPs zur DNA nur moderat ist und durch niedrige pH-Werte begünstigt wird (pH-Wert überdauernder Sporen 6,3 - 6,5), kommt es aufgrund des pH-Wertanstiegs (pH ~8) und der zusätzlichen Ionenstärke (Na^+) zur Dissoziation der SASPs von der DNA (Kosman & Setlow, 2003). Folglich sind im Sporenkern aktive Germinationsproteasen (GPR) in der Lage SASPs zu spalten und somit Aminosäuren für den Metabolismus der sich neu entwickelnden Zelle bereitzustellen (Abb. 1.5; Abb. 1.6) (Setlow, 1988).

Um die SASPs nicht schon während der Entwicklung von Sporen (Abb. 1.1) abzubauen, unterliegt die GPR einer genauen und zeitlichen Regulation (Abb. 1.6).

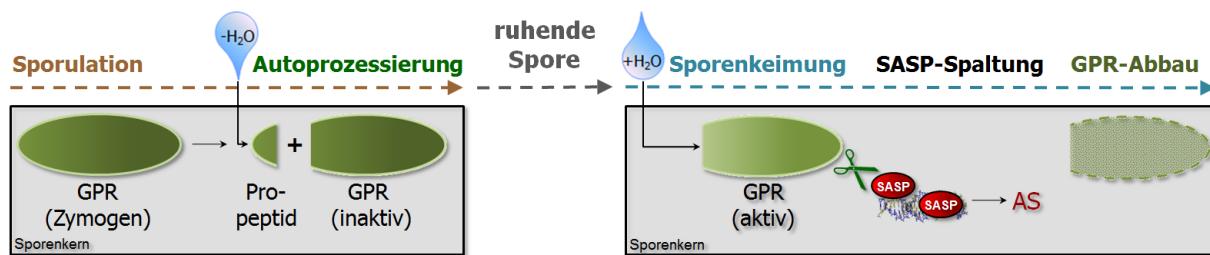


Abb. 1.6: Bildung und Regulation der Germinationsprotease (GPR) im Sporenkern (Lunze, 2014b; mod.). GPR: Germinationsprotease; SASP: Small acid-soluble spore protein; AS: Aminosäuren.

Die Protease wird zunächst als eine inaktive Vorstufe im Kern der Spore gebildet (Zymogen, Abb. 1.6) (Setlow, 1988). Im Laufe der Sporenenwicklung wird durch eine Verringerung des Wassergehalts im Sporenkern die Abspaltung eines N-terminalen Propeptids von der Protease ermöglicht. Dieser Prozess erfolgt autokatalytisch und führt zur Aktivierung des Enzyms (Autoprozessierung, Abb. 1.6). Aufgrund des drastisch geringen Wassergehalts kann die GPR jedoch keine Funktion ausführen und verharret inaktiv in der Spore (Hackett & Setlow, 1983). Erst bei der Sporenenkeimung dringt Wasser in den Kern ein und ermöglicht eine Aktivität der Protease, infolgedessen die SASPs sequenzspezifisch gespalten werden können. Anschließend wird die GPR selbst in einem Energie-abhängigen Prozess abgebaut (Loshon *et al.*, 1982).

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und rekombinanten Plasmide sind in den nachfolgenden Tabellen 2.1, 2.2 aufgelistet. Die Vektoren befinden sich im Anhang (Tab. 7.2)

Tabelle 2.1: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Typstamm	Laborsammlung Nr. 205
<i>C. acetobutylicum</i> <i>spo0A::int(242a)</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 242./243. Bp von <i>spo0A (cac2071)</i> , Ery ^R	Heap <i>et al.</i> , 2007 Nr. 612
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac2365::int(103a) 22</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 103./104. Bp von <i>sspA (cac2365)</i> , Ery ^R	Wetzel, 2012 Nr. 280
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac2365::int(103a) 21</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 103./104. Bp von <i>sspA (cac2365)</i> , Ery ^R	diese Arbeit Nr. 569
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac2365::int(103a) 15</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 103./104. Bp von <i>sspA (cac2365)</i> , Ery ^R	diese Arbeit Nr. 571
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac1522::int(120s)</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 120./121. Bp von <i>sspB (cac1522)</i> , Ery ^R	Wetzel, 2012 Nr. 278
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac1620::int(41s)</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 41./42. Bp von <i>sspD (cac1620)</i> , Ery ^R	Wetzel, 2012 Nr. 279
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac2372::int(43a)</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 43./44. Bp von <i>sspF (cac2372)</i> , Ery ^R	Wetzel, 2012 Nr. 282
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac1663::int(53s)</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 53./54. Bp von <i>sspH (cac1663)</i> , Ery ^R	diese Arbeit Nr. 573
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac1487::int(39s) 5a</i>	Gruppe II Intron integriert zw. 39./40. Bp von <i>tpl (cac1487)</i> , Ery ^R	Stecker, 2012 Nr. 574
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac2365::int(103a)22_</i> <i>pTcatP::P(sspA)sspA</i>	<i>sspA (cac2365)</i> Mutante, <i>pTcatP::P(sspA)sspA</i> (Ery ^R , Tm ^R)	Wetzel, 2012 Nr. 283
<i>C. acetobutylicum</i> <i>cac2365::int(103a)22_</i> <i>pTcatP::P(sspA)sspF</i>	<i>sspA (cac2365)</i> Mutante, <i>pTcatP::P(sspA)sspF</i> (Ery ^R , Tm ^R)	diese Arbeit Nr. 577
<i>E. coli</i> ER2275	<i>mcrA, mcrBC, hsdR, recA1</i>	Mermelstein & Papoutsakis, 1993 Nr. 271
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, (φ80lacZΔM15),</i> <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990 Nr. 272
<i>E. coli</i> BL21	<i>F⁻, ompT, hsdSB (rB⁻, mB⁻), gal, dcm, rne131</i>	Novagen
<i>E. coli</i> DH5α	<i>pT::sspA (cac2365)</i> (C-term. Strep-tag II); Cm ^R ,	diese Arbeit Nr. 594
<i>pTcatP::sspA</i>	<i>Amp^R</i>	
<i>E. coli</i> DH5α	<i>pT::P(fac)sspF (cac2372)</i> (C-term. Strep-tag II);	diese Arbeit Nr. 596
<i>pTcatP::P(fac)sspF</i>	<i>Ery^R, Amp^R</i>	

Fortsetzung nächste Seite

<i>E. coli</i> DH5α	pT::sspB (<i>cac1522</i>) (C-term. Strep-tag II); Cm ^R ,	diese Arbeit
pTcatP::sspB	Amp ^R	Nr. 597
<i>E. coli</i> DH5α	pT::sspD (<i>cac1620</i>) (C-term. Strep-tag II); Cm ^R ,	diese Arbeit
pTcatP::sspD	Amp ^R	Nr. 598
<i>E. coli</i> DH5α	pT::sspH (<i>cac1663</i>) (C-term. Strep-tag II); Cm ^R ,	diese Arbeit
pTcatP::sspH	Amp ^R	Nr. 599
<i>E. coli</i> DH5α	pT::tlp (<i>cac1487</i>) (C-term. Strep-tag II); Cm ^R ,	diese Arbeit
pTcatP::tlp	Amp ^R	Nr. 600
<i>E. coli</i> DH5α	pT::gpr (<i>cac1275</i>) (C-term. Strep-tag II); Cm ^R ,	diese Arbeit
pTcatP::gpr	Amp ^R	Nr. 601
<i>E. coli</i> DH5α	pT::yyaC (<i>cac2857</i>) (C-term. Strep-tag II); Cm ^R ,	diese Arbeit
pTcatP::yyaC	Amp ^R	Nr. 602

Tabelle 2.2: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Relevantes Merkmal	Insert	Herkunft/Referenz
pMTL007C::sspH	pMTL007C-E2 1663_Intron, <i>Hind</i> III/ <i>Bsp</i> 1407I (<i>Bsr</i> GI)	350 Bp	diese Arbeit Nr. 582
pTcatP::P(sspA)sspA	<i>cac2365</i> Promotor, <i>cac2365</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	695 Bp	diese Arbeit Nr. 585
pTcatP::P(sspA)sspB	<i>cac2365</i> Promotor, <i>cac1522</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	698 Bp	diese Arbeit Nr. 587
pTcatP::P(sspA)sspD	<i>cac2365</i> Promotor, <i>cac1620</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	692 Bp	diese Arbeit Nr. 588
pTcatP::P(sspA)sspF	<i>cac2365</i> Promotor, <i>cac2372</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	761 Bp	diese Arbeit Nr. 586
pTcatP::P(sspA)sspH	<i>cac2365</i> Promotor, <i>cac1663</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	674 Bp	diese Arbeit Nr. 589
pTcatP::P(sspB)sspB	<i>cac1522</i> Promotor, <i>cac1522</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	698 Bp	diese Arbeit Nr. 630
pTcatP::P(sspD)sspD	<i>cac1620</i> Promotor, <i>cac1620</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	692 Bp	diese Arbeit Nr. 631
pTcatP::P(sspF)sspF	<i>cac2372</i> Promotor, <i>cac2372</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	761 Bp	diese Arbeit Nr. 591
pTcatP::P(sspF)sspA	<i>cac2372</i> Promotor, <i>cac2365</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	736 Bp	diese Arbeit Nr. 592
pTcatP::P(sspH)sspH	<i>cac1663</i> Promotor, <i>cac1663</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	674 Bp	diese Arbeit Nr. 632

2.2 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide sind in der Tabelle 7.1 (Anhang) aufgelistet.

2.3 Nährmedien

Hitzestabile Lösungen und Nährmedien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm; Sarstedt).

2.3.1 Nährmedien für *Clostridium acetobutylicum*

Anaerobe Medien für die Anzucht von *C. acetobutylicum* wurden nach Breznak und Costilow (1994) hergestellt. Nach Einstellung des pH-Werts, erfolgte das Aufkochen in der Mikrowelle bis zum Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin (0,1 % [w/v]), um gelösten Sauerstoff zu entfernen. Während der Abkühlung verhinderte eine Durchgasung mit molekularem N₂ ein erneutes Lösen von Luftsauerstoff. Anschließend wurden die Kulturgefäße sofort luftdicht verschlossen und autoklaviert. Vor Verwendung der Nährmedien konnte durch das Reduktionsmittel Titan-(III)-NTA (2.3.3) eventuell vorhandener Restsauerstoff entfernt werden. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe weiterer Medienzusätze (Tab. 2.3).

CGM (clostridial growth medium) (Wiesenborn *et al.*, 1988; mod.)

Glukose x H ₂ O (50% [w/v]) ¹	50	ml
Hefeextrakt	5	g
Asparagin	2	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
NaCl	1	g
K ₂ HPO ₄	0,75	g
KH ₂ PO ₄	0,75	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,71	g
MnSO ₄ x H ₂ O	10	mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10	mg
Resazurin (0,1% [w/v])	1	ml
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

¹ Nach dem Autoklavieren wurde Glukose direkt vor dem Beimpfen des Mediums aus einer sauerstofffreien, sterilen Stammlösung (50 % [w/v]) zugesetzt.

MS-MES Medium (medium synthétique)^{1,3} (Monot *et al.*, 1982; mod.)

Glukose x H ₂ O	60	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22	g
KH ₂ PO ₄	0,55	g
K ₂ HPO ₄	0,55	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	11	mg
Eisessig (konz.)	2,3	ml
MES ¹	21,3	g
PABA (8 mg/l) ²	10	ml
Biotin (0,08 mg/l) ²	1	ml
Resazurin (0,1 %, [w/v])	1	ml
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

¹ Vor der Zugabe von MES wurde der pH auf 6,6 mit NH₄OH eingestellt. ² Diese Komponenten wurden aus Stammlösungen vor dem Autoklavieren zugegeben. ³ Das Medium eignet sich zur Erzeugung von *C. acetobutylicum* Sporensuspensionen.

RCA (reinforced clostridial agar)¹

Glukose x H ₂ O	5	g
Hefeextrakt	3	g
Trypton	10	g
NaCl	5	g
Fleischextrakt	10	g
Na-Aacetat	3	g
Cystein-HCl	0,5	g
Stärke	1	g
Agar-Agar	15	g
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

¹ Der pH-Wert lag ohne weitere Einstellung bei 6,8 und wurde als Komplettmedium von der Firma Oxoid (Wesel) erworben.

Minimalmedium für Vorkulturen (MMfVK) (Fischer *et al.*, 2006)

Glukose (50 % [w/v]) ¹	40	ml
CaCO ₃	1	g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	1	g
KH ₂ PO ₄	1	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
NaCl ²	10	mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O ²	10	mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O ²	10	mg
MnSO ₄ x H ₂ O ²	15	mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O ²	15	mg
PABA ²	2	mg
Thiamin-HCl ²	2	mg
Biotin ²	0,1	mg
Resazurinlösung (0,1 % [w/v])	1	ml
Na ₂ S ₂ O ₄	35	mg
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

¹ Nach dem Autoklavieren wurde Glukose direkt vor dem Beimpfen des Mediums aus einer sauerstofffreien, sterilen Stammlösung (50 % [w/v]) zugesetzt. ² Diese Komponenten wurden zusammen als 100x Stammlösung angesetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen und der Verwendung in der benötigten Menge kann die Stammlösung bis zu dreimal wieder eingefroren werden.

Minimalmedium für Sporulation¹ (Rieger, 2006)

Glukose (50 % [w/v]) ²	50	ml
KH ₂ PO ₄	0,14	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
NaCl ³	10	mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O ³	10	mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O ³	10	mg

Fortsetzung nächste Seite

MnSO ₄ x H ₂ O ³	15	mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O ³	15	mg
PABA ³	2	mg
Thiamin-HCl ³	2	mg
Biotin ³	0,1	µg
Resazurinlösung (0,1 % [w/v])	1	ml
Buttersäure (100 % [v/v])	3,7	ml
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

¹ Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 2 M KOH auf 5,6 eingestellt. ² Nach dem Autoklavieren wurde Glukose direkt vor dem Beimpfen des Mediums aus einer sauerstofffreien, sterilen Stammlösung (50 % [w/v]) zugesetzt. ³ Diese Komponenten wurden zusammen als 100x Stammlösung angesetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen und der Verwendung in der benötigten Menge kann die Stammlösung bis zu dreimal wieder eingefroren werden.

2.3.2 Nährmedium für *Escherichia coli*

E. coli-Zellen wurden entweder in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Nähragarplatten über Nacht bei 37 °C kultiviert. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe weiterer Medienzusätze (Tab. 2.3).

LB-Medium (Luria-Bertani)¹ (Sambrook und Russell, 2001)

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

¹ Zur Herstellung von Nähragarplatten erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von 1,5 % [w/v] Agar-Agar.

2.3.3 Medienzusätze

Tab. 2.3: Medienzusätze

Medienzusatz	Stammkonzentration [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]	
		<i>E. coli</i>	<i>C. acetobutylicum</i>
Ampicillin (Amp)	50 in <i>A. dest.</i> (sterilfiltriert) ¹	100	
Chloramphenicol (Cm)	34 in Ethanol (96 % [v/v]) ²	25	
Erythromycin (Ery)	50 in Ethanol (96 % [v/v]) ²	-	20
Tetracycyclin (Tet)	10 in Ethanol (96 % [v/v]) ²	10	
Thiamphenicol (Tm)	50 in Ethanol (96 % [v/v]) ²	-	15
X-Gal	20 in DMF	40	

¹ Porengröße 0,2 µm. ² In Ethanol (reinst) gelöste Substanzen brauchen nicht sterilfiltriert werden.

Titan-(III)-NTA-Lösung

Die Herstellung von Titan-(III)-NTA ist in der Dissertation Schulz (2013) erläutert. Zur Reduktion von Restsauerstoff erfolgt die Zugabe von 2-3 Tropfen des niedervalenten Titans zu 10-ml Medium (CGM, MS-MES; 2.3.1).

2.4 Stammkulturen und Reinheitskontrolle

Stammhaltungen von *C. acetobutylicum* erfolgten als Sporensuspension in MS-MES Medium (2.3.1). Dafür wurden die Kulturen bis zur Sporulation (~5 Tage) bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen kultiviert und anschließend bei -20 °C gelagert. Für eine längerfristige Lagerung der Sporen wurden Stammkulturen angelegt, die bei -70 °C aufbewahrt wurden. Stämme, deren Sporen Keimungsdefizite aufwiesen (*C. acetobutylicum cac2365::int(103a)*; Tab. 2.1), konnten durch Zugabe von 0,5 ml anaerober CGM-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], CGM-Medium 40 % [v/v]) zu 1 ml logarithmisch wachsenden Zellen in 2-ml Schraubdeckelröhren bei -70 °C konserviert werden.

Zur Stammhaltung von *E. coli*-Stämmen wurden 1 ml einer exponentiell wachsenden Zellsuspension zu 0,5 ml LB-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) zugegeben und diese nach gründlicher Durchmischung bei -70 °C gelagert. Eine Vitalitätskontrolle der Stammkulturen erfolgte durch regelmäßiges Ausplattieren auf Festmedium und lichtmikroskopischer Überprüfung auf einheitliche Zellmorphologien.

2.5 Zellanzucht

2.5.1 Anaerobe Zellanzucht von *C. acetobutylicum*

2.5.1.1 Anzucht in statischer Kultur (Batch-Kultur)

Batch-Kulturen von *C. acetobutylicum* erfolgten anaerob unter N₂-Atmosphäre bei 37 °C in Hungate-Röhrchen (OCHS) oder Müller&Krempel-Serumflaschen. Zur Inokulation dienten 0,1 Vol. einer MS-MES-Sporensuspension (2.3.1) oder 1 ml einer CGM-Glycerin-Stammkultur (2.4) für die Anzucht einer 10-ml-CGM-Batch-Vorkultur. Zur einheitlichen Aktivierung von Sporen wurden nur diese nach der Inokulation pasteurisiert (10 min, 80 °C). Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 24 h. Vorkulturen dienten der Anzucht von Batch-Hauptkulturen in Müller&Krempel-Serumflaschen, die aufgrund des Druckanstiegs durch Gasentwicklung nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens gefüllt wurden. Wachstumsexperimente erfolgten in MS-MES Medium. Dazu wurde die CGM-Vorkultur auf zwei 10-ml-MS-MES-Vorkulturen überimpft, die zur Inokulation einer 200-ml-Batch-Hauptkultur verwendet wurden. Die Hauptkultur wurde in der Regel mit einer optischen Dichte (OD₆₀₀, 2.6.1) von 0,1 inkuliert. Untersuchungen des Wachstums erfolgten durch regelmäßige Messungen der OD₆₀₀, des pH-Wertes und der gebildeten Gärungsprodukte (2.6.6).

2.5.1.2 Anzucht in pH-regulierter statischer Kultur

Die pH-regulierten statischen Kulturen vom *C. acetobutylicum* erfolgten in einem „BIOSTAT B“ Fermentersystem mit einem Fassungsvolumen von 10-l. Die Vorbereitung der CGM-Vorkulturen verlief wie unter 2.5.1.1. Zur Inokulation einer 1,4-l-MMfVK-Batchkultur (2.3.1) dienten 14 x 10-ml-MMfVK-Vorkulturen. Nur eine gut gasende 1-4-l-Batchkultur wurde zur Beimpfung des 10-l-Kulturgefäßes verwendet. Der Aufbau des „BIOSTAT B“ erfolgte wie bei Janssen (2010) beschrieben, allerdings ohne phosphatlimitierendes Vorratsmedium und Auffanggefäß für den Kulturüberstand. Das Wachstum der Zellen wurde mit einer Regel-einheit vom Typ Biostat B (BBI) gesteuert (konstante Temperatur von 37 °C; pH-Wert-kontrolle durch Zugabe von 2 M KOH). Das mit 7,6 l Minimalmedium für Sporulation (2.3.1) gefüllte Kulturgefäß wurde autoklaviert und während des Abkühlens mit N₂ durchgast. Vor dem Beimpfen des Gefäßes mit einer 10 bis 16 h alten und logarithmisch wachsenden 1,4 l-MMfVK-Batchkultur wurde das Medium mit 3 ml Titan-(III)-NTA (2.3.3) bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin reduziert. Während der Anwachphasen wurde die Kultur durchgast, der pH-Wert bei 5,2 konstant gehalten und nur moderat gerührt (50 Upm). Ab einer OD₆₀₀ von ca. 1 wurde auf eine weitere N₂-Durchgasung verzichtet und bei einer OD₆₀₀ von ca. 2 die minimale pH-Wertkontrolle auf 4,7 gesetzt. Mit Beginn des Auftretens erster freier Sporen (ca. 67-97 h) wurde die Temperatur auf 25 °C bis zur Sporenernte (136-144 h, 2.16.1) herabgesetzt, um eine mögliche Auskeimung der Sporen zu reduzieren (Rieger, 2006).

2.5.1.3 Anzucht auf Festmedium

Anzuchten von *C. acetobutylicum* auf Nähragarplatten (RCA, 2.3.1) erfolgten in einer Anaeroben-Werkbank (Meintrup) unter N₂-Atmosphäre bei 37 °C. Die Agarplatten mussten zur Anaerobisierung mindestens 24 h vor ihrer Verwendung eingeschleust werden. Die Gasatmosphäre in der Anaeroben-Werkbank bestand aus 95 % N₂ und 5 % H₂ zur Reduktion von eingetragenem Restsauerstoff.

2.5.2 Aerobe Zellanzucht von *E. coli*

Zellanzuchten von *E. coli* erfolgten bei 37 °C aerob auf Festmedium (LB, 2.3.2) im Brutschrank oder in Flüssigkulturen im Schüttler (180 Upm). Für die Expression von SASPs in *E. coli* BL21 wurden stets frische Transformanten verwendet (2.11.1.3), (Kosman &

Setlow, 2003). Je ein Klon wurde in einer 5-ml-LB-Vorkultur für 8 h bei 30 °C kultiviert. Das Herabsetzen der Temperatur verringerte eine Ausbildung von ‚*inclusion bodies*‘ (Chalmers *et al.*, 1990). Die 5-ml-LB-Vorkultur diente zur Inokulation einer 250-ml-LB-Kultur, welche nur maximal für 6 h bei 30 °C weiter inkubiert wurde, um toxische Effekte auf die *E. coli*-Zellen zu minimieren (Setlow *et al.* 1991). Die Expression von GPR und YyaC erfolgte analog zu den SASPs, jedoch in *E. coli* DH5α (2.11.1.3) und einer Inkubationstemperatur von 37 °C.

2.6 Bestimmung physiologischer Parameter

2.6.1 Optische Dichte

Die optischen Dichte (OD₆₀₀) dient als Wachstumsparameter für Flüssigkulturen und wurde in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000) gegen einen Medienleerwert in Plastikküvetten (Schichtdicke 1 cm) gemessen. Bei Extinktionen über 0,3 erfolgten entsprechende Verdünnungen der Zellsuspension mit *A. dest.*

2.6.2 Berechnung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit

Die Wachstumsrate (μ) ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums einer Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase (Formel 1; Schlegel, 1992). Daraus resultierend kann die Verdopplungszeit (t_d), das Zeitintervall der Zellmasseverdopplung pro Stunde, berechnet werden (Formel 2,).

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{(t - t_0)}$$

Formel 1: Berechnung der spezifischen Wachstumsrate (μ). x_t/x_0 , OD₆₀₀ gemessen zu zwei Zeitpunkten t/t_0 während des exponentiellen Wachstums.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Formel 2: Berechnung der Verdopplungszeit (t_d). μ , spezifische Wachstumsrate.

2.6.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Bakterienzählkammer nach Thoma (0,01 mm Tiefe, 1/25 mm² je Großquadrat) im Doppelansatz mit jeweils 10 µl Probe. Dazu wurden je 6 Großquadrate ausgezählt und der Großquadratmittelwert berechnet (Formel 3).

$$N_{(\text{Zellzahl pro ml})} = \frac{\text{Zellen}}{\text{Großquadrat}} \cdot 2,5 \cdot 10^6 \cdot VDF$$

Formel 3: Berechnung der Zellzahl (N). VDF, Verdünnungsfaktor.

2.6.4 Bestimmung der Dezimalreduktionszeit (D-Wert)

Der D-Wert (Mazzola *et al.*, 2003) ist eine charakteristische Größe für die Hitzeempfindlichkeit von Mikroorganismen und gibt die Zeit an, die erforderlich ist, um bei konstanter letaler Temperatur die Keim- bzw. Sporeanzahl auf 1/10 des Anfangswertes zu vermindern.

$$D_T = \frac{t}{\log N_0 - \log N_t}$$

Formel 4: Berechnung des D-Werts (D_T). T, Sterilisationstemperatur; t, Sterilisationszeit; N₀, Anfangskeimzahl; N_t, Endkeimzahl.

2.6.5 Messung des pH-Werts

Der pH-Wert wurde während der Batch-Kulturen extern mit einem pH-Meter (WTW pH526, Weilheim) überwacht und nach Sedimentation (16.000 x g, 4 °C, 5 min) in einem zellfreien Überstand gemessen.

2.6.6 Gaschromatographie

Analysen und Quantifizierungen der Gärungsendprodukte (Acetat, Butyrat, Aceton, Butanol und Ethanol), in einem zellfreien Überstand von *C. acetobutylicum*, erfolgten mit einem Agilent 7890A Gaschromatographen (Agilent Technologies) und ist detailliert in der Dissertation Lehmann (2012) beschrieben.

2.7 Mikroskopische Methoden

2.7.1 Lichtmikroskopie

Analysen der Zellmorphologien und Bestimmungen der Zell- oder Sporeanzahl (2.6.3) wurden mittels Hellfeldmikroskopie (Olympus CHS-Mikroskop) bei einer 400-fachen Vergrößerung (Objektiv A40LP) durchgeführt.

2.7.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Methode der Transmissionselektronenmikroskopie und die Fixierung der Proben in Zellsuspension ist der Diplomarbeit Zimmermann (2011) zu entnehmen.

2.7.3 Immunelektronenmikroskopie

Der Nachweis von SASP-Antigenen in den Endosporen von *C. acetobutylicum* erfolgte durch Immunelektronenmikroskopie unter Verwendung eines Anti-SspA-Antikörpers (2.15) in Kooperation mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ) der Universität Rostock. Zunächst erfolgte eine Fixierung der Proben (4 % PFA, 0,25 % GA) in Zellsuspension:

1. vorsichtiges Mischen von 980 µl Probe mit 1 ml Fixativ A und 20 µl Glutaraldehyd (25%) in einem 2-ml-Reaktionsgefäß
2. Inkubation für 1 ½ h bei 37 °C und 100 Upm (Thermomixer 5436, Eppendorf)
3. weiter Inkubation für 30 min bei 4 °C und 100 Upm
4. Sedimentation der Zellen (5.000 x g, 4 °C, 10 min)
5. dreimaliges Waschen des Pellets mit 1 ml HEPES-Puffer (0,05 M; pH 7,2)
6. Lagerung des Pellets in 1 ml HEPES-Puffer (0,05 M; pH 7,2) bei 4 °C über Nacht
7. weitere Aufarbeitung am EMZ (Universität Rostock)

Fixativ A¹

8 % Paraformaldehyd (PFA in *A. dest.*)¹

¹ Das Polymer vom EMZ (Universität Rostock) muss vor Gebrauch mindestens 30 min bei 60 °C erhitzt werden.

Das aus der Fixierung resultierende Pellet wurde in einem Tropfen niedrig-schmelzender Agarose (2 % in HEPES-Puffer, 0,05 M), (Fluka, Buchs, Schweiz) bei 40 °C vermischt und durch Zentrifugation (20000 x g, 5 min, RT) an der Spitze des Agaroseblocks gesammelt. Die Postfixierung erfolgte in Osmiumtetroxid (1 %) für 1 h bei RT. Nach Waschung mit *A. dest.* wurde der Agaroseblock für die Dehydrierung und Einbettung in kleinere Stücke geschnitten. Danach erfolgte die Behandlung mit einer aufsteigenden Reihe an Aceton-Lösungen, die durch reines Aceton und einem 1:1 Mix aus Aceton und Kunstharz (Epon 812, Serva) über Nacht beendet wurde. Am nächsten Tag wurden die Stücke in reinem Epoxid-Kunstharz für 4 h eingebettet und in Gummiformen bei 60 °C für zwei Tage ausgehärtet. Nach der Anfertigung von Ultradünnsschnitten (50-70 nm) mit Hilfe eines Ultra-mikrotoms (Ultracut S, Reichert, Wien, Österreich), wurden die Schnitte auf Maschenkupfernetze (300 mesh) aufgebracht und für 5 min mit EM-PBS und anschließend für 1 h mit Blocking-Puffer abgespült. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem primären Anti-SASP

Kaninchenantikörper (Anti-SspA, 2.15), (1:500 verdünnt in EM-Puffer) über Nacht bei 4 °C. Nach fünfmaliger Waschung mit EM-Puffer für 10 min, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Goldpartikel-markierten (10 nm) Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (BBI Solutions, Cardiff, UK), (1:40 verdünnt in EM-Puffer) für 2 h bei RT. Darauffolgend wurde zweimal mit EM-Puffer und dreimal mit EM-PBS für jeweils 10 min gewaschen und die Schnitte nach vorsichtigem Abspülen mit *A. dest.* getrocknet. Eine Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit Uranylacetat und deren Begutachtung an einem EM902 Elektronenmikroskop (Zeiss) (80 kV) bei 20000 bis 30000-facher Vergrößerung.

Blocking-Puffer¹

Ziegenserum (normal)	250	µl
BSA	250	mg
EM-Puffer	ad	10 ml

EM-PBS²

NaPO ₄ -Puffer (0,2 M; pH 7,4)	5 ml
NaCl	0,98 g
<i>A. dest.</i>	ad 100 ml

EM-Puffer¹

Na-P-Puffer (0,2 M; pH 7,4)	2,5 ml
NaCl	0,49 g
Tween 20 (10 %)	500 µl
CWF-Gelatine	125 µl
BSA	0,5 g
<i>A. dest.</i>	ad 50 ml

¹ Nach dem Ansetzen wurden die Puffer sterilfiltriert (0,22 µm) und bei -20 °C gelagert.

² Nach dem Ansetzen des Puffers wurde dieser sterilfiltriert (0,22 µm).

2.8 Isolierung von Nukleinsäuren

2.8.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile und hitzelabile Materialien und Lösungen wurden wie unter 2.3 beschrieben behandelt. Nicht autoklavierbare Gerätschaften wurden mit Ethanol (96 %, [v/v]) gesäubert oder abgeflammt. Die Desinfektion von Arbeitsflächen und hitzelabilen Gebrauchsgegenständen erfolgte mit Ethanol (70 %, [v/v]). Für den Umgang mit RNA benötigte Lösungen und Materialien wurden zweimal autoklaviert und Geräte sowie der Arbeitsplatz mit RNase-ExitusPlus™ (AppliChem) gesäubert. Das Tragen ebenso behandelter Einweghandschuhe minimierte weitere Kontaminationen mit RNAsen.

2.8.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Isolierungen chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* erfolgten aus 50-ml CGM-Medium (2.3.1) mit 0,1 Vol. Inokulum einer CGM-Vorkultur. Nach dem Wachstum der Zellen bis zu

einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37 °C, erfolgte die Sedimentation der Zellen (6.000 x g, 4 °C, 5 min), welche mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, in 2-ml-Reaktionsgefäßten aufgeteilt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert wurden. Die Isolierung der DNA erfolgte nach Bertram (1989; mod.) und ist in der Dissertation Schulz (2013) erläutert. Die Qualitätsüberprüfung der DNA erfolgte mittels Agarosegelektrophorese (0,8 %, 2.9.2.1).

2.8.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* Endosporen

Gereinigte Endosporen (2.16.2.2) wurden einer DNase I-Behandlung unterzogen, um noch vorhandene DNA lysierter, vegetativer Zellen zu entfernen (Mauchline *et al.*, 2010; mod.). Dazu wurde das Sporenpellet in 0,5 ml *A. dest.* suspendiert und unter Zugabe von 50 µl DNase-Puffer und 10 µl DNase I (1 U/µl, AppliChem) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Reaktion bei 75 °C für 10 min und eine Sedimentation der Zellen (10.000 x g, 10 min, 4 °C). Nach dem Waschen des Sporenpellets mit 5 ml Waschpuffer konnte die Isolierung der Sporen-DNA (Waterman *et al.*, 2006; mod.) erfolgen. Hierfür wurde das Pellet in 5,5 ml Lysis-Puffer mit 550 µl Lysozym-Lösung (200 mg/ml) und 27,5 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml) suspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert, wobei alle 5 min invertiert wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 165 µl SDS-Lösung (20 % [w/v]) und 165 µl Proteinase K (20 mg/ml) und die weitere Inkubation für 30 min bei 37 °C. Je 500 µl der behandelten Suspension wurde in ein Schraubdeckelröhrchen (2-ml) mit 1 g Kieselglaskugeln (0,1 mm, Sigma) und 583 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1 [v/v/v]) vermischt. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Sporen mittels FastPrep (Thermo Savant) bei einer Geschwindigkeit von 4,0 m/s mit jeweils 4 Zyklen für 30 s, wobei zwischen den Zyklen 1 min auf Eis inkubiert wurde. Die aufgeschlossenen Sporen wurden zentrifugiert (7.500 x g, 10 min, 4 °C), die obere wässrige Phase abgenommen und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und anschließend wie folgt behandelt (Bertram, 1989; mod.):

1. Zugabe von 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v])
2. Zentrifugation (10 min, 7.500 x g, 4 °C)
3. Abnahme der oberen, wässrigen Phase und Überführung in ein 2 ml- Reaktionsgefäß
4. Wiederholung der Schritte 1.- 3.
5. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) zur Phenolentfernung
6. Zentrifugation (5 min, 9.000 x g, 4 °C) und Abnehmen der oberen, wässrigen Phase
7. DNA-Fällung mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) + 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v])

Fortsetzung nächste Seite

8. Inkubation: 5 min bei RT und anschließende Zentrifugation (15 min, 5.000 x g, 4 °C)
9. Trocknen des Pellets, anschließende Aufnahme in 60 µl TE-Puffer
10. Zugabe von 15 µl RNase A (10 mg/ml) und Inkubation für 15 min bei 37 °C
11. Zugabe von 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) und Inkubation über Nacht bei 37 °C
12. Erhöhung des Volumens mit *A. dest.* auf 400 µl
13. Zugabe von 60 µl 3 M Na-Aacetat (pH 5,2)
14. Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Schritte 1.-3.)
15. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (Schritte 5.-6.)
16. DNA-Fällung mit 0,1 Vol. 3 M Na-Aacetat (pH 5,2) + 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v])
17. Zentrifugation (15 min, 5.000 x g, 4 °C), Überstand verwerfen
18. zweimaliges Waschen des Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst)
19. Zentrifugation (5 min, 13.000 x g, 4 °C)
20. Trocknen des Pellets und Aufnahme in 7,5 µl TE-Puffer oder *A. dest.*
21. Vereinigung von vier DNA-Präparaten (~30 µl)

Die Qualitätsüberprüfung der DNA erfolgte mittels Agarosegelektrophorese (0,8 %, 2.9.2.1).

Waschpuffer

EDTA (0,5 M, pH 8,0)	80	ml	RNase A	10	mg
Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	20	ml	Tris-HCl (pH 7,5)	100	µl
KCl (1 M)	50	ml	NaCl	9	mg
<i>A. dest.</i> ad	400	ml	<i>A. dest.</i> ad	1	ml

¹ Nach dem Ansetzen der Lösung wurde diese zur Inaktivierung von DNasen 15 min bei 100 °C erhitzt und nach dem Abkühlen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Lysis-Puffer²

NaCl (5 M)	4	ml	Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	10	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	20	ml	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2	ml
<i>A. dest.</i> ad	200	ml	<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

² Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 7,5 eingestellt. ³ Der pH-Wert wurde mit 0,1 M HCl auf 8,0 eingestellt.

Lysozym-Lösung⁴

Lysozym	200	mg	Proteinase K	20	mg
<i>A. dest.</i> ad	1	ml	<i>A. dest.</i> ad	1	ml

⁴ Die Lysozym-Lösung wurde für den Gebrauch frisch angesetzt. ⁵ Die Lösung wurde in 30-µl-Aliquots bei -20 °C gelagert. Nach einmaligem Auftauen wurde das Aliquot verworfen.

TE-Puffer³

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	10	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2	ml
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

Proteinase K-Lösung⁵

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

Isolierungen von Gesamt-RNA erfolgten nach Oelmüller *et al.*, (1990; mod.). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden während des Wachstums in 200-ml-MS-MES-Kultur (2.3.1) 30-ml-Proben entnommen und zentrifugiert (7.500 x g, 5 min, 4 °C). Die Pellets wurden sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Die Isolierung der Gesamt-

RNA erfolgte mittels „Hot Phenol“-Extraktion und ist der Dissertation Janssen (2010) zu entnehmen. Für die 5'-RACE-PCR (2.10.2.3) und sqRT-PCR Analyse (2.10.2.4) wurde die RNA mit RNase-freier DNase I (10 U/ μ l), (Roche) nach Jansen (2010) behandelt. Die Qualitätsüberprüfung der RNA erfolgte in sterilen Agarosegelen (1 %, 2.9.2.1).

2.8.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Isolationen von Plasmid-DNA erfolgten nach einer Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). In der Regel dienten 4 ml einer Übernachtkultur (LB, 2.3.2) zur Gewinnung der Plasmid-DNA. Das Protokoll ist in der Diplomarbeit Wetzel (2012) erläutert.

2.9 Molekularbiologische Standardmethoden

2.9.1 Reinigung von Nukleinsäuren

2.9.1.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Extraktionen von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgten nach deren elektrophoretischer Auf trennung und Ethidiumbromidfärbung (2.9.2.1), durch das Ausschneiden mit einem Skalpell unter UV-Licht. Für die Aufreinigung der DNA wurde nach Angaben des Herstellers das „Gel extraction Kit“ (Genaxxon) verwendet. Eine Qualitätsüberprüfung der DNA erfolgte mittels Agarosegelektrophorese (0,8 %; 2.9.2.1).

2.9.2 Agarosegelektrophorese

2.9.2.1 Standard-Gelelektrophorese

Analytische Auf trennungen von DNA-Molekülen erfolgten mittels horizontaler Agarosegel-elektrophorese (Sambrook & Russell, 2001) und diente der qualitativen und quantitativen Beurteilung. In Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente variierte die Agarose-konzentration (0,8 - 2 % [w/v] in 1x TAE-Puffer). Zur Markierung der Lauffront und für ein vollständiges Einsinken der Proben, wurden die DNA vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. eines 6x Loading Dyes versetzt. Für die Größenbestimmung der Nukleinsäuren wurden Längen-standards (Thermo Scientific) aufgetragen. Die Auf trennung erfolgte bei 70-90 V (Power Pack P 25; Biometra) in einem 1x TAE-Puffersystem. Nach der Färbung des Gels im Ethidium-bromidbad (1 μ g/ml in *A. dest.*), erfolgte die Dokumentation der Nukleinsäuren bei 254 nm in

einer Photodokumentationsanlage (MWG-Biotech). Für die Agarosegelektrophorese von RNA wurden die Elektrophoresetensilien gesondert gereinigt (2.8.1) und es wurde mit steriler Agarose und sterilem Laufpuffer gearbeitet.

2.10 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.10.1 Primerdesign

Um eine Amplifikation von Zielgenen zu ermöglichen wurden spezifische Oligonukleotide abgeleitet. Für die Klonierungen von Fragmenten wurden zudem am 5'- und 3'-Ende der Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen eingefügt. Berechnungen der Schmelztemperaturen erfolgten durch OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

2.10.2 PCR-Techniken

Für die Standard-PCR-Analysen wurde die peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab) verwendet, deren Reaktionsansatz sich folgendermaßen zusammensetzte:

Template-DNA		10-100	ng		
dNTPs (10 mM)	20		μM		
Primer fw (10 μM)	1		μM		
Primer rev (10 μM)	1		μM		
10x <i>Pwo</i> -Puffer (complete)	5		μl		
MgSO ₄ (25 mM)	2		μl		
<i>Pwo</i> -Polymerase (1 U/μl)	1		μl		
<i>A. dest.</i>	ad	50	μl		

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Denaturierung	94 °C	30	s		1 x
Denaturierung	94 °C	30	s		
Annealing	T _m (Primer)-3 °C	60	s		
Elongation	72 °C	1	min/kBp		
Elongation	72 °C	5	min		
Lagerung	4 °C	∞	unendlich		

2.10.2.2 „Splicing by overlap extension“ (SOE)-PCR

Das für die Insertionsmutagenese verwendete Gruppe II Intron des ClosTron® Systems (2.12) kann durch entsprechend abgeleitete Oligonukleotide an das jeweilige Zielgen mittels SOE-

PCR (Ho *et al.*, 1989) angepasst werden. Hierzu wurden drei dem Zielgen angepasste Oligonukleotide (IBS, EBS1d, EBS2), (Tab. 7.1) und ein Intron-spezifisches Oligonukleotid (EBS Universal) in entsprechenden Molaritäten als Vier-Primer-Mix in einer PCR eingesetzt. Dabei wurden IBS und EBS1d im Überschuss verwendet, um verstärkt die Bildung des 350-Bp-Introns zu gewährleisten. Als Template-DNA diente der Vektor pMTL007C (Tab. 7.2).

Zusammensetzung des Vier-Primer-Mix:

IBS Primer	(100 µM)	2	µl
EBS1d Primer	(100 µM)	2	µl
EBS2 Primer	(20 µM)	2	µl
EBS Universal	(20 µM)	2	µl
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	20	µl

2.10.2.3 5'-RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte (TSP) von Genen wurde das 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurde isolierte Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum* (2.8.4) mit Hilfe des Kits in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte unter Verwendung Gen-spezifischer Oligonukleotide (S1; S2, Tab. 7.1) die Amplifikation der 5'-mRNA, welche mittels Agarosegelelektrophorese (1 %, 2.9.2.1) analysiert und anschließend sequenziert wurde (LGC Genomics).

2.10.2.4 sqRT-PCR (semi-quantitative Reverse Transkriptase-PCR)

Um die Transkription von Genen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchen zu können, erfolgten sqRT-PCR-Analysen. Dafür wurde isolierte Gesamt-RNA von *C. acetobutylicum* (2.8.4) mit Hilfe des 5'/3' RACE Kit (2.10.2.3) in cDNA umgeschrieben und entsprechend verdünnt für PCR-Analysen (2.10.2.1) unter Verwendung Gen-spezifischer Oligonukleotide (Tab. 7.1) eingesetzt. Nach 30 PCR-Zyklen wurden die DNA-Fragmente in 1 % Agarosegelen analysiert (2.9.2.1). Die Eub-PCR ist dabei der Dissertation Janssen (2010) zu entnehmen.

2.10.3 Enzymatische Modifikation von DNA

2.10.3.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen

Behandlungen von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgten nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific), wobei diese in der folgenden Tabelle 2.4 aufgelistet sind.

Tabelle 2.4: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz¹	Puffersystem
<i>Bam</i> HI	5'-G \wedge GATCC-3' 3'-CCTAG \vee G-5'	10x <i>Bam</i> HI-Puffer
<i>Cfr</i> 9I (<i>Xma</i> I)	5'-C \wedge CCGGG-3' 3'-GGGCC \vee C-5'	10x <i>Cfr</i> 9I-Puffer
<i>Hind</i> III	5'-A \wedge AGCCT-3' 3'-TTCGG \vee A-5'	10x Tango™
<i>Bsp</i> 1407I (<i>Bsr</i> GI)	5'-T \wedge GTACA-3' 3'-ACATG \vee T-5'	10x Tango™
<i>Fnu</i> 4HI (<i>Sat</i> I)	5'-GC \wedge NGC-3' 3'-CGN \vee CG-5'	10x Puffer G
<i>Pst</i> I	5'-CTGCA \wedge G-3' 3'-G \vee ACGTC-5'	10x Puffer O
<i>Msp</i> I (<i>Hpa</i> II)	5'-C \wedge CGG-3' 3'-GGC \vee C-5'	10x Tango™

¹ N = A, T, C oder G; \wedge Restriktionsschnittstellen

2.10.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Selbstligation hydrolysiert Vektor-DNA zu minimieren, wurde diese mit alkalischen Phosphatase (FastAP, Thermo Scientific) zur Dephosphorylierung der 5'-Enden behandelt. Dazu erfolgte die direkte Zugabe von 2 U FastAP (1 U/ μ l) in den Restriktionsansatz und eine weitere Inkubation für 30 min bei 37 °C. Nach einer Hitzeinaktivierung (75 °C, 5 min) erfolgte die Aufreinigung der DNA mit dem „Plasmid PLUS DNA Purification Mini Prep Kit“ (Genaxxon) nach den Angaben des Herstellers.

2.10.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen von DNA-Fragmenten erfolgten durch die T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) mit einer Konzentration von 1 U/ μ l in einem 1x T4-Ligase-Puffer für 30 min bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C. Dabei lag das molare Verhältnis von Vektor und Insert bei 1:3 in einem Standardvolumen von 20 μ l. Der Ligationsansatz konnte direkt für die Transformation in CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen (2.11.1.1) verwendet werden.

2.11 Erzeugung rekombinannten Mikroorganismen

2.11.1 DNA-Transfer in *E. coli*

2.11.1.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter bzw. elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Um die Aufnahme rekombinanter Plasmide zu ermöglichen, erfolgte eine künstliche Behandlung von *E. coli*-Zellen mit CaCl₂ (Hanahan, 1983; mod.) oder für die elektrokompetenten Zellen mit Glycerinlösung (10 % [v/v]). Die Protokolle für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen sind der Diplomarbeit Wetzel (2012) zu entnehmen.

2.11.1.2 CaCl₂-vermittelte Transformation in *E. coli*

Für CaCl₂-vermittelte Transformationen von Vektor-DNA in *E. coli* Zellen wurde der Ligationsansatz (2.10.3.3) verwendet. Dazu wurden 5-20 µl Ligationsansatz mit 50 µl kompetenten Zellen, die zuvor auf Eis aufgetaut wurden, versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C und eine Inkubation für 2 min auf Eis. Die Regeneration der Zellen erfolgte durch Zugabe von 900 µl LB-Medium (2.3.2) und einer Inkubation für 1 h bei 37 °C und 400 Upm (Thermomixer, Eppendorf). Anschließend wurden 50-200 µl der Zellen zur Selektion auf LB-Festmedium mit entsprechenden Zusätzen (Tab. 2.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.11.1.3 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Elektroporationen von *E. coli* (BL21, DH5α, ER2275) mit Vektor-DNA (Dower *et al.*, 1988) erfolgten unter Verwendung eines GenePulserII™ (Bio-Rad). Dafür wurden Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) bei -20 °C vorgekühlt und mit 0,5-2,5 µl Vektor-DNA und 40 µl elektrokompetenten Zellen (2.11.1.1), die zuvor auf Eis aufgetaut wurden, befüllt. Die Elektroporation wurde bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV durchgeführt, wobei Zeitkonstanten von 4,5-5,2 ms erreicht wurden. Im Anschluss erfolgte die Regeneration der Zellen durch Zugabe von 500 µl LB-Medium (2.3.2) und einer Inkubation für 1 h bei 37 °C. Darauffolgend wurden 20-100 µl der Zellen auf Selektionsfestmedium (2.3.2, Tab. 2.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.11.2 DNA-Transfer in *C. acetobutylicum*

Transformationen von *C. acetobutylicum* erfolgten nach Mermelstein *et al.* (1992) mit Hilfe eines GenePulserII™ (Bio-Rad). Die Elektroporation wurde unter anaeroben Bedingungen in einer Anaeroben-Werkbank (Meintrup) und unter Verwendung stets frisch herstellter kompetenter *C. acetobutylicum* Zellen durchgeführt. Dafür wurden 50-ml CGM-Medium (2.3.1) mit einer CGM-Vorkultur inkkuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 bei 37 °C

inkubiert. Das Protokoll für den DNA-Transfer in *C. acetobutylicum* ist der Dissertation Voigt (2014) zu entnehmen.

2.12 ClosTron® Insertionsmutagenese

Mit Hilfe des ClosTron® Systems (Heap *et al.*, 2007, 2010) kann eine gezielte Inaktivierung von Genen durch Insertionsmutagenese erfolgen. Zuvor wird ein Algorithmus angewendet (<http://clostron.com/clostron2.php>), um den bestmöglichen Insertionsort im Zielgen und entsprechende Oligonukleotide für die Insertionsmutagenese abzuleiten (Tab. 7.1). Das mobiles Gruppe II Intron wird anschließend mittels SOE-PCR (2.10.2.2) an das Zielgen angepasst und das resultierende 350-Bp-Insert durch Hydrolyse mit *Hind*III und *Bsp*1407I in den Vektor pMTL007C-E2 (Tab. 7.2) kloniert. Nach einer Methylierung des Konstrukts in *E. coli* ER2275 (2.11.1.3), kann eine Transformation in *C. acetobutylicum* erfolgen (2.11.2). Erfolgreiche Transformanten werden auf RCA-Medium (2.3.1) mit Thiamphenicol (Tab. 2.3) selektiert, wovon eine resistente Kolonie in 500 µl CGM-Medium (2.3.1) für 4 h inkubiert wird. Während dieser Wachstumsphase kommt es zur Integration des Introns in das Genom von *C. acetobutylicum* und führt zur Ausbildung einer Erythromycin-Resistenz, wodurch eine nachfolgende Selektion auf RCA-Medium mit Erythromycin (Tab. 2.3) möglich ist. Für den Nachweis der korrekten Integration in das Zielgen werden die resistenten Klone mittels PCR-Analysen (2.10.2.1) und im Southern Blot unter Verwendung einer Gen-spezifischen und ErmRAM-spezifischen Sonde verifiziert (2.13.2).

2.13 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

2.13.1 Sonden-Markierung

Digoxygenin (DIG)-markierte DNA-Sonden für Blot-Analysen wurden mit dem „DIG-DNA Labeling Kit“ (Roche) nach den Angaben des Herstellers generiert.

2.13.2 Übertragung von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Der Kapillarblot (Southern, 1975) ermöglicht die Übertragung elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen, um durch Hybridisierung mit markierten Sonden (2.13.1) spezifisch Gensequenzen nachweisen zu können. Dazu erfolgte nach entsprechender

Hydrolyse der DNA (Tab. 2.4), deren Auftrennung in einem Agarosegel (1 %, 2.9.2.1). Das Gel wurde anschließend für 10 min in 0,25 N HCl gewaschen, um Einzelstrangbrüche zu erzeugen und den Transfer zu erleichtern. Danach folgte eine Denaturierung und Neutralisierung für jeweils 30 min. Währenddessen wurden Nylonmembran und Whatman-Papier (Schleicher & Schuell) auf die Gelgröße zugeschnitten. Vor dem Aufbau des Blots wurde sowohl das Gel, als auch die Nylonmembran in 2x SSC-Puffer für 5 min äquilibriert. Auf einen Stapel Filterpapier (~10 cm Höhe) wurden 4 Lagen Whatman-Papier, zuvor in 2x SSC-Puffer angefeuchtet, aufgeschichtet und luftblasenfrei die Nylonmembran und das Agarosegel platziert. Der Aufbau wurde mit einer Glasscheibe und einem Gewicht (500 g) stabilisiert. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgten in ca. 15-20 h und wurde anschließend durch beidseitiges „cross-linking“ für 3 min bei 254 nm kovalent fixiert.

Denaturierungspuffer			Neutralisierungspuffer¹		
NaOH		35,06 g	NaCl		87,66 g
NaCl		16 g	Tris		60,55 g
A. dest.	ad	1000 ml	A. dest.	ad	1000 ml

¹ Der pH von 7,5 wurde vor dem Autoklavieren mit konzentrierter HCl eingestellt.

20x SSC-Puffer²

NaCl	175	g
Na ₃ -Citrat x H ₂ O	88,2	g
A. dest.	ad	1000 ml

² Der pH-Wert von 7,0 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

2.13.2.1 Southern Blot - Hybridisierung

Die Nylonmembranen wurde in einem Hybridisierungsröhrchen (Ochs) mit 20 ml Hybridisierungslösung in einem entsprechenden Ofen (Biometra) bei 42 °C vorbehandelt, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Anschließend wurde die DIG-markierte DNA-Sonde (2.13.1) in 5 ml Hybridisierungslösung gelöst und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Vorhybridisierungslösung wurde verworfen, die noch heiße Sonde auf die Membran gegeben und für 16-24 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen bei gleichmäßiger Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 2x SSC, 0,1 % SDS [w/v] Puffer für jeweils 15 min gewaschen und konnte für die Detektion (2.13.2.2) direkt eingesetzt werden.

Hybridisierungspuffer

20x SSC-Puffer	12,5	ml
Formamid	25	ml
Blocking-Reagenz	1	g
Laurylsarkosin (0,1 % [w/v])	250	µl
SDS (10 % [w/v])	100	µl
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	50	ml

2x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS

20x SSC-Puffer	100	ml
SDS (10 % [w/v])	10	ml
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

2.13.2.2 Detektion Digoxigenin-markierter DNA

Detektionen DIG-markierter DNA erfolgten mit einem Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat (Roche). Dabei setzt die Antikörper-gekoppelte alkalische Phosphatase (AP), chromogene Substrate wie NBT (Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) um, was zu einem tiefblauen Farbumschlag führt und dem Nachweis der DNA dient. Die Membran wurde hierfür 1 min mit Puffer 1 gewaschen und anschließend 1-2 h in Puffer 2 bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Puffer 1 für 5 min, erfolgte die Inkubation mit 20 ml Antikörper-Konjugat-Lösung für 30 min bei RT. Darauf folgte das zweimalige Waschen mit Puffer 1 für jeweils 15 min und die Äquilibrierung der Membran mit Puffer 3 für 2 min. Der optische Nachweis erfolgte im Dunkeln mit 5 ml Färbelösung bis eine ausreichende Färbung der Banden erzielt wurde. Die Reaktion konnte durch Waschung mit *A. dest.* gestoppt werden.

Puffer 1¹

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	100	ml
NaCl	8,76	g
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

Antikörper-Konjugat-Lösung

Puffer 1	20	ml
Anti-DIG-AP-Konjugat	4	µl

¹ Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 7,5 eingestellt.

Puffer 2

Puffer 1 mit 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz
(Roche, Mannheim)

Färbelösung

Puffer 3	5	ml
NBT/BCIP-Lösung	40	µl

Puffer 3²

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	100	ml
NaCl	5,84	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,17	g
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

² Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 9,5 eingestellt.

2.14 Arbeiten mit Proteinen

2.14.1 Zellaufschluss vegetativer Zellen mittels Ultraschall

Für die Herstellung zellfreier *E. coli*-Lysate wurde eine 250 ml LB-Kultur (2.3.2) sedimentiert (6.000 x g, 10 min, 4 °C), (Sorvall RC6+, Rotor F12-6 x 500 LEX), das resultierende Pellet in 5 ml Puffer W (2.14.6) suspendiert und bei -20 °C bis zum Aufschluss der Zellen gelagert. Für die Lyse der Zellen wurden diese aufgetaut und mittels Ultraschall (UP200S Hielscher) und S2 Sonotrode mit 10 x 10 Impulsen (80 % Amplitude, 0,8 Cycle) auf Eis behandelt. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde die Suspension zentrifugiert (13.000 x g, 30 min, 4 °C) und der geklärte Überstand für eine Affinitätschromatographie (2.14.6) verwendet.

2.14.2 Zellaufschluss von Endosporen mittels FastPrep

Für den Aufschluss von Endosporen mittels FastPrep, wurden zuvor behandelte Sporen (6×10^8 Sporen/ml), (2.16.2.2) in 300 µl Essigsäure (3 % [v/v]), 100 µl PMSF (100 mM [w/v]) und 100 µl EDTA (0,5 M [w/v]) gelöst und in 2-ml-Schraubdeckelrörchen mit 400 mg Kieselglaskugeln (150-212 µm, Sigma) überführt. PMSF und EDTA dienten als Sporenpotease-Inhibitoren (Setlow, 1976). Die Lyse der Sporen erfolgte mit Hilfe eines FastPrep Homogenisator (Thermo Savant) bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s mit jeweils 5 Zyklen für 45 s. Zwischen den Zyklen erfolgte eine Inkubation auf Eis für 1 min. Die aufgeschlossenen Sporen wurden anschließend direkt für die Extraktion säurelöslicher Sporenproteine (2.14.3) verwendet.

2.14.3 Extraktion säurelöslicher Sporenproteine (SASPs)

Die Extraktion säurelöslicher Sporenproteine (SASPs) erfolgte nach Setlow (1975a, b; mod.). Dazu wurden die mittels FastPrep aufgeschlossenen Endosporen (2.14.2) in ein 500-ml-Becherglas überführt und für 1 h bei 4 °C in 120 ml Extraktionspuffer unter Rühren (250 Upm) gelöst. Anschließend wurde die Suspension sedimentiert (7.500 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand gesammelt und das Pellet erneut in 40 ml Extraktionspuffer unter Rühren gelöst (30 min, 4 °C). Nach wiederholter Zentrifugation wurden beide Überstände vereinigt und einer Dialyse gegen Essigsäure (1 % [v/v]), (2.14.4) unterzogen.

Extraktionspuffer

Essigsäure (100 %)	30	ml	>	3 %
HCl (konz.)	2,49	ml	>	30 mM
PMSF (0,1 M [w/v])	40	ml	>	4 mM
EDTA (0,5 M [w/v])	40	ml	>	20 mM
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml		

2.14.4 Dialyse von Proteinen

Vor der Aufreinigung von SASPs über Ionenaustauschchromatographie (2.14.7), erfolgte eine Dialyse gegen 1 % Essigsäure in einem acetylierten Dialyseschlauch (2.14.4.1), (Setlow, 1975a, b). Die Sporenextrakte (2.14.3) wurden in einem 5-l-Reservoir mit Essigsäure (1 % [v/v]) bei 4 °C über 36 h dialysiert. Währenddessen wurde der Puffer dreimal gewechselt. Im Anschluss wurde das Dialysat gesammelt, lyophilisiert (Labovac PK8S) und in 5-15 ml Essigsäure (1 % [v/v]) gelöst. Die Proben konnten direkt auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2.14.7.1) appliziert oder in SDS-Gelen (2.14.8.1) analysiert werden.

2.14.4.1 Acetylierung von Dialyseschläuchen

Für die Dialyse wurde ein Dialyseschlauch (Serva Electrophoresis, MWCO 3500 Da) verwendet. Da SASPs sehr klein sind (6-10 kDa), erfolgte zuvor eine Verringerung der Porosität der Cellophanmembran nach Craig (1967). Dazu wurde der Dialyseschlauch in Essigsäureanhydrid mit Pyridin (25 % [v/v]) für 4 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Essigsäure (0,01 M [v/v]) wurde der Dialyseschlauch über Nacht in Essigsäure (0,01 M) äquilibriert. Zur Vorbereitung auf die Dialyse (2.14.4), wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 1 % Essigsäure gelagert und der Puffer währenddessen dreimal gewechselt.

Essigsäureanhydrid in Pyridin

Pyridin (wasserfrei)	225	ml
Essigsäureanhydrid	75	ml

2.14.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Methode nach Bradford (1976) ermöglicht die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen. Dazu wurde zellfreier Überstand mit *A. dest.* entsprechend verdünnt, je 50 µl davon mit 1-ml-Bradford-Reagenz versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm in einer Plastikküvette (Schichtdicke 1 cm) in

einem Photometer (Ultrospec 3000, Amersham) gegen einen Blindwert ($50 \mu\text{l} A. dest.$ + 1 ml Bradford-Reagenz) gemessen. Anhand einer mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichreihe von 0-0,15 mg/ml, konnte die Konzentration der Proteine berechnet werden.

Bradford-Reagenz¹

Brillant-Blau G-250	70	ml
Ethanol (96 % [v/v])	50	ml
H ₃ PO ₄ (85 % [v/v])	100	ml
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

¹ Das Reagenz wurde lichtgeschützt bei RT gelagert.

2.14.6 Affinitätschromatographie an *Strep-Tactin-Sepharose*

Die Aufreinigung rekombinanter *Strep-Tag*[®] II Fusionsproteine aus geklärten Lysaten von *E. coli* (2.14.1) erfolgte über eine Affinitätschromatographie mittels *Strep-Tactin-Sepharose* (IBA) und ist der Dissertation Riebe (2009) zu entnehmen. Die gewonnenen Proteinfraktionen wurden hinsichtlich ihrer Konzentration im Bradford-Assay (2.14.5) und ihrer Reinheit in SDS-Gradientengelen (2.14.8.1) überprüft. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -20 °C.

2.14.7 Ionenaustauschchromatographie

Eine Abtrennung und Aufreinigung der SASPs von anderen Sporenproteinen ist durch Ionenaustauschchromatographie möglich (Setlow, 1975a, b). Dabei werden die im Dialysat befindlichen SASPs (2.14.4) von negativ-geladenen Fremdproteinen an einem Anionenaustauscher (2.14.7.1) abgetrennt und im zweiten Schritt durch ihre positive Ladung an einen Kationenaustauscher gebunden (2.14.7.2). Die Elution der Proteine erfolgt anschließend mit Hilfe eines Salzgradienten (Setlow, 1975a, b).

2.14.7.1 Anionenaustauscher (DEAE-Cellulose)

Das Dialysat (5-15 ml, 2.14.4) wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2,6 x 10 cm) appliziert und bei einer Flussrate von 0,5 mit 120 ml Essigsäure (1 % [v/v]) eluiert. Die 1-ml-Fraktionen wurden auf ihre Proteinkonzentration untersucht (2.14.5), wobei proteinhaltige Fraktionen gesammelt und lyophilisiert (Labovac PK8S) wurden. Die Proben wurden anschließend in 2-6 ml Tris-Maleinsäure (10 mM [w/v], pH 6,1) gelöst und auf eine CM-Cellulose-Säule aufgetragen (2.14.7.2).

2.14.7.2 Kationenaustauscher (CM-Cellulose)

Der DEAE-Durchfluss (2-6 ml, 2.14.7.1) wurde auf eine CM-Cellulose-Säule (2,6 x 18 cm) appliziert und zunächst mit 120 ml Säulenpuffer (10 mM Tris-Maleinsäure [w/v], pH 6,1) bei einer Flussrate von 0,5 äquilibriert. Die Elution erfolgte anschließend durch zwei aufeinanderfolgende lineare Gradienten von a) 0-0,4 M NaCl über 240 ml Säulenpuffer und b) 0,4-1 M NaCl über 400 ml Säulenpuffer. Fraktionen (2 - 2,5 ml) von Äquilibrierung und Elutionen wurden gesammelt und auf ihre Proteinkonzentration (2.14.5) bestimmt. Entsprechend proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt, gegen 1 % Essigsäure dialysiert (2.14.4) und nach Lyophilisierung (Labovac PK8S) in 50-100 µl Essigsäure (1 % [v/v]) gelöst. Die Fraktionen konnten in SDS-Gelen (2.14.8.1) analysiert und bei -20 °C gelagert werden.

2.14.8 Polyacrylamidgelelektrophorese

2.14.8.1 SDS-Gradientengelelektrophorese (10-20%)

Für die Auftrennung besonders kleiner Proteine (≤ 10 kDa) konnten Trenngele mit einem Acrylamidgehalt von 10-20 % verwendet werden. Der Gehalt des Sammelgels betrug dabei stets 4 % (v/v). Die Anfertigung der Gele, sowie die gelelektrophoretische Auftrennung und kolloidale Coomassie-Färbung sind in der Masterarbeit Lehmann (2013) beschrieben.

2.14.8.2 Western Blot

Übertragungen von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen erfolgten nach Towbin *et al.*, (1979; mod.) und sind in der Dissertation Schulz (2013) erläutert.

2.14.8.2.1 Detektion von *Strep-tag® II* Fusionsproteinen

Nachweise der *Strep-tag® II* Fusionsproteine erfolgten mit Hilfe des *Strep-Tactin®-AP*-Antikörpers (IBA). Für die Detektion der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Blottvorgang (2.14.8.2) über Nacht bei 4 °C in Blocking-Puffer inkubiert und anschließend wie folgt behandelt:

1. kurzes Waschen der Membran mit 1x TGST-Puffer bei RT
2. Inkubation in 50 ml 1x TGST-Puffer und 5 µl *Strep-Tactin® AP*-Antikörper für 45 min
3. dreimalige Waschen mit 1x TGST-Puffer für je 10 min
4. Behandlung mit Färbelösung im Dunkeln, bis ausreichende Färbung der Banden erreicht, dann Abstoppen der Reaktion mit *A. dest.*

Blocking-Puffer¹			Färbelösung		
1x TGST-Puffer	50	ml	1x AP-Puffer	5	ml
BSA	0,5	g	NBT/BCIP-Lösung	40	µl
Magermilchpulver	2,5	g			

¹ Um Kreuzreaktionen von *Strep*-Tactin und Biotin Carboxyl Carrier Proteinen (BCCP, 16,7 und 22,5 kDa) von *E. coli* zu vermeiden, wurde eine Spatelspitze Avidin zugegeben.

10x TGST-Puffer²			10x AP-Puffer³		
Tris	1,21	g	Tris	1,2,1	g
NaCl	8,55	g	NaCl	5,7	g
Tween 20	0,5	ml	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,47	g
<i>A. dest.</i> ad	100	ml	<i>A. dest.</i> ad	100	ml

² Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 8,0 eingestellt und der Puffer bei 4 °C gelagert. ³ Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 9,5 eingestellt und der Puffer bei 4 °C gelagert.

2.14.8.2.2 Doppelimmunpräzipitation und Detektion

Proteinnachweise mittels Doppelimmunpräzipitation beruhten auf Kreuzreaktionen eines primären Antikörpers (Anti-SspA; 2.15) mit seinem Antigen und der darauffolgenden Bindung eines sekundären Antikörpers (Anti-Rabbit IgG, Sigma), der mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt war. Nach erfolgtem Western Blot (2.14.8.2) wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in Blocking-Puffer inkubiert und anschließend wie folgt behandelt:

1. kurzes Waschen der Membran mit 1x TGST-Puffer
2. Inkubation über Nacht (4 °C) in 30 ml 1x TGST + 6 µl Primärantikörper (Anti-SspA)
3. dreimaliges Waschen mit 1x TGST-Puffer für je 10 min bei RT
4. Inkubation für 45 min bei RT in 30 ml 1x TGST-Puffer + 1,5 µl Sekundärantikörper (Anti-IgG)
5. dreimaliges Waschen mit 1x TGST-Puffer für je 10 min
6. Behandlung mit Färbelösung im Dunkeln (ca. 10-30 min), bis ausreichende Färbung der Banden erreicht, dann Abstoppen der Reaktion mit *A. dest.*

Die verwendeten Puffer sind unter (2.14.8.2.1) beschrieben.

2.14.9 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

MALDI-TOF MS-Analysen von Proteinen erfolgten in Kooperation mit der Universität Greifswald bei Frau Dr. Birgit Voigt (Abteilung Mikrobiologie, AG Hecker) und ist in der Dissertation Janssen (2010) beschrieben.

2.14.10 Protein-Assays

2.14.11 Bindungsassay von SASPs und Nukleinsäuren

Für die Nukleinsäure-Bindestudie nach Raju *et al.* (2006), wurde chromosomal DNA (2.8.2) und Gesamt-RNA von *C. acetobutylicum* (2.8.4), Plasmid-DNA (2.8.5) (pT-catP, Tab. 7.2) aus *E. coli* und *Arabidopsis thaliana* DNA (zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Timm, Abteilung Pflanzenphysiologie, Universität Rostock) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde zuvor mit *Pst*I (Tab. 2.4) linearisiert. Die SASP *Strep*-tag-Fusionsproteine wurden wie unter 2.5.2 beschrieben gewonnen und aufgereinigt (2.14.6).

Für die DNA-Bindestudie wurde 1 µg Plasmid-DNA, chromosomal DNA oder *A. thaliana* DNA mit jeweils 3 µg rekombinantem SASP in 25 µl TAE-Puffer für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe 3 µl 10x DNase I-Puffer und 2 µl DNase I (1 mg/ml, AppliChem, Darmstadt) und eine weitere Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl SDS-Lösung (1,25 %, [w/v]), 13 µl NaCl (5 M) und 600 µl Ethanol (96 %, [v/v]) abgestoppt und die DNA über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation (13.000 x g, 30 min, 4 °C) und zweimaligem Waschen des Pellets mit 500 µl Ethanol (70 %, reinst) wurde das Pellet luftgetrocknet und in 10 µl *A. dest.* suspendiert. Analysen der DNA erfolgten in 1,5 % Agarosegelen (2.9.2.1). Für die RNA-Bindestudie wurde statt DNA, 1 µg Gesamt-RNA von *C. acetobutylicum* und 2,5 µl RNase (1 mg/ml, AppliChem) verwendet. Die RNA-Pellets wurden in sterilen 1,5 % Agarosegelen analysiert.

TAE-Puffer¹ (Raju *et al.*, 2006)

Tris		0,97	g
EDTA		0,30	g
<i>A. dest.</i>	ad	800	ml

¹ Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Essigsäure auf 7,0 eingestellt.

2.14.12 Autoprozessierungs-Assay für GPR und YyaC

Analysen zur Autoprozessierung erfolgten in einem Autoprozessierungs-Puffer nach Carroll & Setlow (2005). Dabei ermöglicht unter anderem der hohe Anteil an DMSO (50 %) eine Abspaltung von Propeptiden bei GPR-typischen Proteasen. Die GPR und YyaC *Strep*-tag-Fusionsproteine wurden wie unter 2.5.2 beschrieben gewonnen und aufgereinigt (2.14.6). Jeweils 3 µg rekombinantes Protein wurde in 25 µl Autoprozessierungs-Puffer über Nacht bei

30 °C inkubiert und anschließend in einem SDS-Gradientengel nach Coomassie-Färbung (2.14.8.1) oder im Western Blot (2.14.8.2.1) analysiert.

Autoprozessierungs-Puffer¹

MES	1,71	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	58,81	mg
Glycerin	8	ml
DMSO ²	40	ml
<i>A. dest. ad</i>	80	ml

¹ Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,2 eingestellt. ² Die Zugabe von DMSO erfolgte nach dem Autoklavieren und einer Abkühlung auf RT.

2.14.13 Substratspezifität von GPR und YyaC

Untersuchungen der Substratspezifitäten erfolgten nach Carroll (2008; mod.). Dazu wurde natives Gesamtprotein aus *C. acetobutylicum* Endosporen (4 µg, 2.14.4) mit den Zymogenen von GPR oder YyaC im Verhältnis 1:5 (Extrakt:Protease) in 25 µl Autoprozessierungs-Puffer (2.14.12) bei 37 °C inkubiert. Nach 12 h bzw. 24 h erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer (2.14.8.1) und die Lagerung der Probe bei -20 °C. Als Kontrolle auf eine unspezifische Proteaseaktivität in den Sporenextrakten, wurden diese (4 µg) in 25 µl Autoprozessierungs-Puffer für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Analysen erfolgten anschließend in SDS-Gradientengelen nach kolloidaler Coomassie-Färbung (2.14.8.1).

2.14.14 Bestimmung der spezifischen Aktivität (SA)

Spezifische Aktivitäten wurden nach Carroll (2008; mod.) anhand der Substrate SspB und SspD bestimmt, wobei stets frisch gewonnene Proteasen verwendet wurden, da eine Lagerung bei -20 °C maßgeblich ihre Aktivität beeinflusste. SspB oder SspD (2 µg) wurde in Autoprozessierungs-Puffer (2.14.12) zusammen mit dem Zymogen von GPR (1:5, SASP:GPR) oder dem Zymogen von YyaC (1:6, SASP:YyaC) bei 37 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 25 µl Probe der Reaktion entnommen und mit Probenpuffer (2.14.13) gestoppt. Eine Analyse der Spaltprodukte erfolgte in SDS-Gradientengelen nach Coomassie-Färbung (2.14.8.1). Die spezifische Aktivität (SA), ist dabei wie folgt definiert (Carroll, 2008):

$$\text{Spezifische Aktivität (SA)} = \frac{\mu\text{g SASP}}{\mu\text{g Protease} \cdot \text{h}}$$

Formel 5: Berechnung der spezifischen Aktivität (SA). µg SASP gespalten/µg Protease/ h Inkubation.

2.15 Herstellung eines polyklonalen Anti-SspA-Antikörpers

Mit Hilfe des Vektors pT-catP (Tab. 7.2; Abb. 7.12) wurde das *Strep*-tag-Fusionsprotein Cac2365 (SspA), (Tab. 2.1) in *E. coli* BL21 überexprimiert (2.5.2) und aufgereinigt (2.14.6.). Insgesamt konnte 0,82 mg rekombinantes Protein gewonnen werden. Die Kopplung an den Träger KLH (keyhole Limpet Hemocyanin), sowie die Immunisierung von drei Kaninchen erfolgte durch Pineda (Antikörper-Service). Nach einer Basis-Immunisierung (1. Tag) folgten am 61., 90., und 120. Tag weitere subkutane Injektionen mit der gleichen Menge an Antigen. Nach dem 120. Tag wurde das Serum durch Pineda gewonnen.

2.15.1 Antikörper-Reinigung mittels Affinitätschromatographie

Aufreinigungen der IgG-Antikörper aus den Seren der 3 Versuchskaninchen (2.15) erfolgten über eine Protein-A-Sepharose-Säule (HiTrap HP, 5 ml, Pharmacia), welche zuvor mit 15 ml Waschpuffer äquilibriert wurde. Die Reinigung der Antikörper erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde 10 ml Serum zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C), anschließend mit je 12 ml Waschpuffer verdünnt und auf die Protein-A-Sepharose-Säule appliziert. Die Bindung der IgG-Antikörper erfolgte über ein Säulenvolumen von 45 ml Waschpuffer bei einer Flussrate von 1,0. Die anschließende Elution der Antikörper erfolgte durch Elutionspuffer über ein Säulenvolumen von 30 ml. Die Fraktionen (3-ml) wurden aufgefangen, die proteinhaltigen Fraktionen gesammelt und bei -20 °C gelagert.

Elutionspuffer¹	Waschpuffer		
Glycin	0.1	M	K ₃ PO ₄ (pH 7,3)
NaCl	0.1	M	NaCl

¹ Der pH-Wert wurde mit HCl auf 2,8 eingestellt.

2.16 Arbeiten mit Endosporen

2.16.1 Sporenernte

Endosporen einer 200-ml-MS-MES- (2.5.1.1) oder einer 9-l-Batch-Kultur (2.5.1.2) wurden nach 5-7 Tagen geerntet. Bei der 200-ml-Kultur wurden alle Sporen sukzessive mit je 45 ml in ein 50-ml-Zentrifugen-Röhrchen sedimentiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C) und das resultierende Pellet anschließend zweimal mit 5 ml *A. dest.* (4 °C) gewaschen. Für die Dichtegradientenzentrifugation (2.16.2.1) verblieben die Sporen über Nacht in 5 ml *A. dest.* bei 4 °C, um die

Lyse sporeenträgender Mutterzellen zu fördern (Nicholson & Setlow, 1990). Bei der 9-l-Kultur wurden je 400 ml in jeweils sechs Zentrifugenbecher (Sorvall RC6+, Rotor F12-6 x 500 LEX) sukzessive sedimentiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C), bis das Kulturgefäß leer war. Anschließend wurden die Pellets zweimal mit 30 ml *A. dest.* (4 °C) gewaschen und bei -20 °C bis zur Lysozymbehandlung (2.16.2.2) gelagert.

2.16.2 Aufreinigung von Sporen

2.16.2.1 Dichtegradientenzentrifugation

Je 500 µl Sporensuspension in *A. dest.* (5 ml, 2.16.1) wurden auf einen 90 % Percoll-Gradienten appliziert. Die Ausbildung des Gradienten ist der Diplomarbeit Rieger (2006) zu entnehmen. Aufgrund der Dichte befinden sich die Sporen anschließend unten im Gradienten und können mit einer langen Kanüle (B. Braun AG) abgenommen (max. 1 ml) und in 2-ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Nach dreimaligem Waschen mit *A. dest.* (4 °C), wurde das Pellet in 500 µl *A. dest.* gelöst und für die Bestimmung der Endosporeanzahl (2.6.3) verwendet. Sporen können in *A. dest.* bei 4 °C gelagert werden (Harwood & Cutting, 1990), sollten jedoch zügig bearbeitet werden, da eine Keimung bereits über Nacht (4 °C) eintritt.

2.16.2.2 Lysozymbehandlung

Sporen der 9-l-Batch-Kultur wurden von noch restlichen vegetativen Zellen durch Lysozymbehandlung (Tavares *et al.*, 2013; mod.) befreit. Dazu wurde das Sporenpellet (2.16.1) in 13 ml Lysis-Puffer und 1,4 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Sedimentation (10.000 x g, 10 min, 4 °C), folgte die Waschung des Pellets mit 10 ml *A. dest.* (4 °C). Unter Vortexen wurde das Pellet anschließend in 9 ml *A. dest.* und 1 ml SDS-Lösung (10 % [w/v]) gelöst und nach erneuter Sedimentation (10.000 x g, 10 min, 4 °C) dreimal mit 10 ml *A. dest.* gewaschen. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Überprüfung auf die Reinheit der Sporen (2.7.1). Reine Sporen wurden für die Isolierung von DNA aus Sporen (2.8.3) oder für die Isolierung von SASPs (2.14.2) verwendet.

Lysis-Puffer¹

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	2	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,4	ml
<i>A. dest.</i> ad	200	ml

Lysozym-Lösung²

Lysozym	100	mg
<i>A. dest.</i> ad	10	ml

¹ Der pH-Wert wurde anschließend mit HCl auf 7,5 eingestellt. ² Die Lösung wurde für den Gebrauch frisch angesetzt.

2.16.3 Messung der Dipicolinsäure (DPA)

Messungen der Dipicolinsäure (DPA) erfolgten nach Nicholson & Setlow (1990). Dabei kommt es durch eine Hitzebehandlung zur Freisetzung von DPA aus Sporen, welche mit zweiwertigen Eisenionen im Reagenz zu einem Chelatkomplex reagiert, der bei 440 nm nachweisbar ist. Für die DPA-Messung wurde 1 ml mit 4×10^6 Sporen/ml (2.16.2.1) verwendet, welche für 20 min bei 80 °C erhitzt und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert wurden. Nach Zentrifugation der Suspension (13.000 x g, 2 min, RT) wurde der Überstand in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und 0,4 ml davon mit 0,2 ml Assay-Reagenz und 0,4 ml *A. dest.* versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 x g, 2 min, RT) wurde der Überstand in einer Plastikküvette (Schichtdicke 1 cm) in einem Photometer (Ultrospec 3000, Amersham) bei 440 nm gegen einen Blindwert (0,8 ml *A. dest.* + 0,2 ml Assay-Reagenz) gemessen. Über eine DPA-Eichreihe (0, 10, 20, 40, 70, 100 µg/ml) konnte die Konzentration der Dipicolinsäure in den Sporen bestimmt werden.

Assay-Reagenz¹

L-Cystein	5 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	62,23 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 mg
Na-Aacetat-Puffer (0,05 M)	ad 5 ml

Natriumacetat-Puffer²

Na ₂ -Acetat x 3 H ₂ O	0,68 g
<i>A. dest.</i> ad	100 ml

¹ Die Assay-Lösung wurde für den Gebrauch frisch angesetzt und ist max. 2 h bei RT haltbar. ² Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Essigsäure auf 4,6 eingestellt.

2.16.4 Keimung von Sporen auf Festmedium

2.16.4.1 Sporen-Assay

Behandelte Sporen (2.16.4.2, 2.16.4.3) wurden unter anaeroben Bedingungen (Anaeroben-Werkbank, Meintrup) zunächst mit PBS-Puffer (2.16.4.3) verdünnt (Verdünnungsreihe: 10^0 - 10^{-5}), Anschließend wurden von jeder Verdünnungsstufe je 10 µl im Doppelansatz auf RCA-Medium (2.3.1) aufgetropft. Nach Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C erfolgte die Auszählung der „colony forming units“ (CFU) und die Berechnung der CFU/ml (Wiegand *et al.*, 2008):

$$N_{(CFU/ml)} = \frac{C \cdot 10}{10^{-D}}$$

Formel 6: Berechnung der CFU/ml (N). C, Anzahl an Kolonien; D, Anzahl der jeweiligen 1:10 Verdünnungsstufe.

2.16.4.2 Behandlung von Sporen mit feuchter Hitze

Gereinigte Sporen mit $4,0 \times 10^6$ Sporen/ml (2.16.2.1) wurden in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und einem Hitzestress bei 80 °C im Wasserbad ausgesetzt. Nach jeweils 10, 20, 30 und 40 min Inkubation, wurden 100 µl Probe der Reaktion entnommen und sofort auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit Hilfe eines Sporen-Assays (2.16.4.1) analysiert. Als Referenz (t_0) dienten reinen unbehandelte Proben mit 4×10^6 Sporen/ml.

2.16.4.3 Entmantelung von Endosporen

Um einen Einfluss des Sporenmantels auf das Keimungsverhalten von Sporen zu untersuchen, wurde eine Entmantelung nach Burns *et al.*, (2010; mod.) vorgenommen. Dazu wurden $6,0 \times 10^6$ Sporen/ml (2.16.2.1) zunächst sedimentiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C), das Pellet in 1 ml Entmantelungs-Puffer gelöst und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, anschließend für 10 min bei 80 °C pasteurisiert und die Probe in einem Sporen-Assay (2.16.4.1) analysiert.

Entmantelungs-Puffer ¹				PBS-Puffer ²			
Tris	50	mM		NaCl	8	g	
Urea	8	M		KCl	0,2	g	
SDS	1	%		Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1,81	g	
DTT	50	mM		KH ₂ PO ₄	0,24	g	
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	100	ml	<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	100	ml

¹ Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 8,0 eingestellt. ² Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 7,4 eingestellt.

2.16.5 Keimung von Sporen in Flüssigmedium

Reine Sporen (2.16.2.1) wurden mit *A. dest.* auf eine Konzentration von $4,0 \times 10^6$ Sporen/ml verdünnt. Jeweils 500 µl dieser Verdünnung wurde unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt und anschließend zur Inokulation einer 10-ml-CGM-Kultur (2.3.1) verwendet. Die Sporen wurden zuvor wie folgt behandelt: a) Hitzebehandlung bei 80 °C für 10 min, b) Hitzebehandlung bei 65 °C für 10 min und c) Referenz unbehandelter Sporen. Nach Behandlung und Inokulation, wurde die Keimungsverhalten und Wachstum in mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanocolor Vis, Macherey-Nagel) bei 600 nm über 24 h verfolgt. Bei Mutantenstämmen (Tab. 2.1) erfolgte die Zugabe entsprechender Medienzusätzen (Tab. 2.3) zum CGM-Medium (2.3.1).

2.17 Bezugsquellen

Tabelle 2.5: Bezugsquellen

Firma	Produkte
Agilent Technologies GmbH, Böblingen,	Agilent 7890A
AMERSHAM Buchler GmbH, Braunschweig	Ultrospec 3000
Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg	HiTrap™ 5 ml Protein A-Sepharose-Säule
Biometra GmbH, Göttingen	Power Pack P 25, Mini-Gelkammern, PCR-Cycler, Hybridisierungsofen, Blotting Apparatur, Nitrocellulosemembran
BIORAD GmbH, München	Gene Pulser™ II
Braun AG, Melsungen	sterile Kanülen
Eppendorf, Hamburg	Thermomixer comfort 5436
Ilmvac GmbH, Ilmenau	Labovac PK8S
Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold	Sorvall RC 6C Plus Zentrifuge
Macherey-Nagel & Co. KG, Düren	Nanocolor Vis
Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Lähden-Holte	MACS-MG-500/MG-1000-anaerobic workstation
MWG-Biotech, Ebersberg	Gelprint 2000
OCHS Laborfachhandel e. K., Bovenden, Olympus, Hamburg	Hungate-Röhrchen, Hybridisierungsröhrchen CH2-Phasenkontrastmikroskop IX-70-Mikroskop
Pinadea Antikörper-Service, Berlin	Anti-SASP Kaninchenantikörper
Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen	BIOSTAT® B
SARSTEDT AG & Co., Nürnberg	50 ml-Röhrchen, 0,2 µm Sterilfilter, Plastikküvetten,
Schleicher&Schuell BioScience GmbH, Dassel	Whatman Papier, Nylonmembran
Thermo Savant, Holbrook, NY, USA	FastPrep Homogenisator (<i>Modell 120A-230</i>)
AppliChem GmbH, Darmstadt	EDTA, PMSF, Formamid, DNase I, RNase A, Lysozym, Hefeextrakt, Proteinase K, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Erythromycin, Ethidiumbromid, Trypton, BSA, RNase-ExitusPlus™, Agarose, Tween-20, DMSO, HEPES
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	BSA (Albumin Fraktion V), Brilliant Blue G-250
Difco Laboratories, Hamburg	Agar-Agar
GE Healthcare, München	Percoll®
Genaxxon BioScience GmbH, Ulm	Gel extraction Kit, Plasmid PLUS DNA Purification Mini Prep Kit
IBA GmbH, Göttingen	<i>Strep</i> -Tactin-Sepharose, Desthiobiotin, <i>Strep</i> -Tactin® AP Konjugat
Oxoid GmbH, Wesel	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	peqGOLD Pwo-Polymerase I, Elektroporationsküvetten
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	RNase-freie DNase I, Blocking Reagenz, DIG DNA-Labeling Kit, DIG-labeled DNA Molecular Weight Marker, Anti-Digoxigenin-AP- Konjugat, 5'/3' RACE Kit 2nd Generation, NBT, BCIP
Serva Electrophoresis, Heidelberg,	dialysis tubing MWCO 3500, Epon 812
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	Ampicillin, Thiamphenicol, Oligonukleotide, Dipicolinsäure, Anti- IgG-Antikörper, DEAE, CM, Kieselglas
Thermo Scientific Inc., Braunschweig	Restriktionsenzyme, Protein Molecular Weight Marker (SM0431, SM0671), GeneRuler 1kb DNA Ladder, MassRuler (SM403), dNTP's, FastAP, T4-DNA-Ligase

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation und Zuordnung der SASPs von *C. acetobutylicum*

Im Genom von *C. acetobutylicum* wurden die Proteine Cac2365 und Cac2372 als „SspA“, Cac1522 und Cac1620 als „SASP“ und Cac1487 als „SASP Tlp“ annotiert (Nölling *et al.*, 2001), wobei letzteres aktuell nur in „Tlp“ (Thioredoxin-like protein) umbenannt wurde (siehe Tab. 3.1). *In silico* Analysen dieser Arbeit stützen zudem ein weiteres hypothetisches Gen, *cac1663*, als SASP-kodierend. Charakteristisch für SASPs ist ein geringes Molekulargewicht (6,7 - 10,1 kDa) und ein recht hoher isoelektrischer Punkt (Tab. 3.1) (Setlow, 1988).

Tab. 3.1: SASPs von *C. acetobutylicum*.

ORF	Benennung	Annotierte Funktion ¹	Gen [Bp]	Protein [AS]	MW [kDa]	pI [pH]	Homologes Gen ³ (Name, ORF, I/Ä [%])
<i>cac2365</i>	<i>sspA</i>	SASP, SspA	198	65	7,2	9,53	<i>sspD</i> , BSU13470 I: 45 / Ä: 62
<i>cac1522</i>	<i>sspB</i>	SASP, α/β-Typ	201	66	7,2	9,32	<i>sspB</i> , BSU09750 I: 29 / Ä: 48
<i>cac1620</i>	<i>sspD</i>	SASP, α/β-Typ	195	64	7,2	5,45	<i>sspD</i> , BSU13470 I: 36 / Ä: 64
<i>cac2372</i>	<i>sspF</i>	SASP, SspA	264	87	10,1	9,67	<i>sspF</i> , BSU00450 I: 21 / Ä: 40
<i>cac1663</i>	<i>sspH</i>	hypothetisch	177	58	6,7	7,19	<i>sspH</i> , BSU08110 I: 26 / Ä: 55
<i>cac1487</i>	<i>tlp</i>	SASP Tlp, Tlp ²	228	75	8,9	6,16	<i>ssp-tlp</i> , BSU18030 I: 43 / Ä: 67

¹ Nölling *et al.*, 2001; ² ursprünglich annotiert als „SASP Tlp“, aktuell (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q97IZ9.1>) bezeichnet als „Tlp“; ³ Homologes Gen in *B. subtilis* 168 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), (Tab. 7.3; Anhang). ORF, offener Leserahmen; Bp, Anzahl an Basenpaaren (inklusive Stopcodon); AS, Anzahl an Aminosäuren; MW, Molekulargewicht der Proteine in Kilodalton [kDa]; pI, pH-Wert des isoelektrischen Punktes; I, Identität Ä, Ähnlichkeit.

SASPs des α/β-Typs sind besonders im Hinblick auf die N- und C-terminalen Regionen, die zur Ausbildung eines Helix-Turn-Helix (HTH) Motivs für eine DNA-Bindung führen, hoch konserviert (Abb. 3.1) (Setlow, 2007). Daher konnte anhand von Konservierungen des DNA-Bindemotivs von α/β-Typ SASPs (Abb. 3.1) (Setlow, 2007; Vyas *et al.*, 2011) und durch „Blast“-Analysen (Cummings *et al.*, 2002) gegen das Genom von *B. subtilis* (Tab. 3.1 und Tab. 7.3; Anhang) eine entsprechende Zuordnung der SASPs von *C. acetobutylicum* vorgenommen werden.

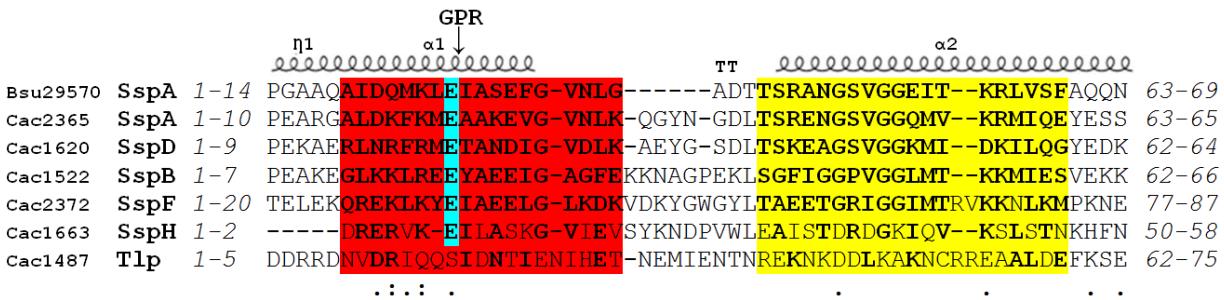


Abb. 3.1: Alignment der SASPs von *C. acetobutylicum* gegen SspA von *B. subtilis*. Konservierte C- und N-terminale α/β -Typ SASP-Motive (<http://prosite.expasy.org>) sind rot (PS00304) und gelb (PS00684) hervorgehoben und führen zur Ausbildung eines Helix-Turn-Helix (η_1 , α_1 , TT, α_2 ; nach Lee *et al.*, 2008) für eine DNA-Bindung. Am hochkonservierten Glutamatrest (E, blau) in der Sequenz E↓IASE erfolgt die Spaltung durch die Germinationsprotease (GPR). Aminosäurereste in den Motiven sind bei SspA, SspB, SspD, SspF zu 100 %; SspH zu 51 % und bei Tlp zu 31 % konserviert und fett hervorgehoben. Cac, *C. acetobutylicum*; Bs, *B. subtilis*.

Im Alignment zeigt Cac2365 (SspA), gemäß seiner Annotation, die höchsten Übereinstimmungen zum SspA-Protein von *B. subtilis* und ist für das DNA-Bindemotiv zu 100 % konserviert (Abb. 3.1). Die Proteine Cac1620 und Cac1522 konnten aufgrund von „Blast“-Analysen einem SspD und SspB zugeordnet werden (Tab. 3.1; Tab. 7.3) und sind ebenfalls für das HTH-Motiv hoch konserviert. Cac2372 weist im Alignment eine eher distanzierte Ähnlichkeit zum SspA-Protein von *B. subtilis* auf und ist zudem im Vergleich zu den anderen SASPs (6,7-7,2 kDa) signifikant vergrößert (10,1 kDa; Tab. 3.1). Durch Ähnlichkeits-Analysen konnten Übereinstimmungen zu einem SspF-Protein ermittelt werden (Tab. 3.1; Tab. 7.3). Die essentiellen Aminosäurereste sind in Cac2372 zu 100 % konserviert (Abb. 3.1). In Bezug darauf konnten bei den Proteinen Cac1663 und Cac1487 vergleichend zu α/β -Typ SASPs (Setlow, 2007; Vyas *et al.*, 2011) nur geringe Übereinstimmungen festgestellt werden. So ist bei Cac1663 nur jede zweite Aminosäure im Motiv konserviert (51 %) (Abb. 3.1), allerdings bestand eine 26 % Übereinstimmung zu einem SspH-Protein aus *B. subtilis* (Tab. 3.1). Für Cac1487 (Tlp) ist eine Konservierung für ein DNA-Bindemotiv kaum vorhanden (32 %) (Abb. 3.1), dennoch zeigte das Protein 43 % Übereinstimmung zu einem „SASP Tlp“ aus *B. subtilis* (Tab. 3.1).

Zusammenfassend konnten durch *in silico* Analysen die Proteine SspA, SspB, SspD und SspF den SASPs zugeordnet werden, unterdessen die Proteine SspH und Tlp nur gering bzw. kaum konservierte Aminosäurereste (Setlow, 2007; Vyas *et al.*, 2011) für ein mögliches HTH-Bindemotiv von α/β -Typ SASPs aufweisen.

3.2 Expression der SASPs von *C. acetobutylicum*

3.2.1 Vorsporen-spezifische Transkription der *ssp* Gene von *C. acetobutylicum*

Microarray-Analysen von Jones *et al.* (2008) zeigten, dass sich die Expression der SASPs von *C. acetobutylicum* auf die frühe stationäre Wachstumsphase beschränkt, in der es zur Entwicklung von Vorsporen kommt (Tracy *et al.*, 2008, 2011). Um dies zu verifizieren wurde Gesamt-RNA von *C. acetobutylicum* während der frühen Sporulation (~27 h, OD₆₀₀: 4,0) isoliert (2.8.4) und in cDNA umgeschrieben (2.10.2.3), um in einer semiquantitativen RT-PCR (sqRT-PCR, 2.10.2.4) die Genprodukte der SASPs zu untersuchen (Abb. 3.2, A). Um dabei eine sporespezifische Expression der SASPs zu demonstrieren, wurde parallel eine *C. acetobutylicum* Mutante analysiert, der Spo0A als Masterregulator der Sporulation fehlte (Heap *et al.*, 2007) und folglich keine Sporenbildung möglich war (Abb. 3.2, B).

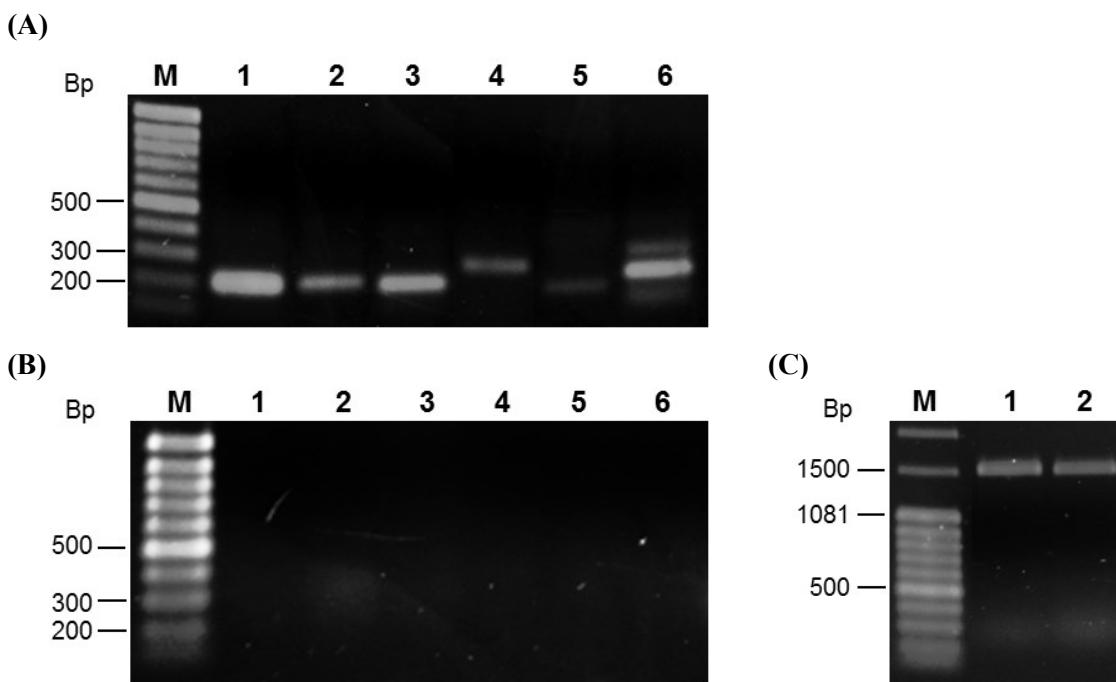


Abb. 3.2: Spezifische mRNA Transkripte der SASPs von *C. acetobutylicum* während der frühen Sporulation. Dargestellt sind 1 % [w/v] Agarosegele. (A) sqRT-PCR Produkte von sporulierenden Zellen und (B) von Zellen der *spo0A* Mutante von *C. acetobutylicum* zum Zeitpunkt der frühen stationären Phase ($t= 27$ h). (C) Als Kontrolle für den Einsatz gleicher cDNA-Mengen wurde das 16S rRNA-Gen mitgeführt (30 Zyklen, 1500 Bp); Spur 1: Wildtyp, Spur 2: *spo0A* Mutante. Amplifikationen der *ssp* Transkripte (A und B; je 30 Zyklen) erfolgten mit genspezifischen Primern für *sspA* (198 Bp, Spur 1), *sspD* (195 Bp, Spur 2), *sspB* (201 Bp, Spur 3), *sspF* (265 Bp, Spur 4), *sspH* (177 Bp, Spur 5) und *tlp* (228 Bp, Spur 6). M, MassRuler DNA Ladder Mix.

Bei den sqRT-PCR-Analysen sporulierender *C. acetobutylicum* Zellen (Abb. 3.2, A) zeigte das *sspA*-Gen die tendenziell stärkste Transkription, gefolgt von *sspB*, *tlp*, *sspD* und *sspF*, wohingegen *sspH* nur sehr schwach transkribiert wurde, so dass spezifische Genprodukte im

Agarosegel kaum zu erkennen waren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expressionen aller SASPs von *C. acetobutylicum* vom dem Masterregulator der Sporulation Spo0A abhängig ist, da in der asporogenen *spo0A* Mutante keine mRNA Transkripte zum Zeitpunkt der frühen stationären Phase nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.2, B).

3.2.2 Regulation der SASPs über sporulationsspezifische Sigma-Faktoren

Da Spo0A eine Kaskade sporulationsspezifischer Sigma-Faktoren reguliert (siehe Einleitung Abb. 1.2) (Al-Hinai *et al.*, 2015), stellte sich die Frage, ob die Promotorregionen der SASPs von *C. acetobutylicum* entsprechende Erkennungssequenzen von Sigma-Faktoren aufweisen. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst mittels 5' RACE (2.10.2.3) Transkriptionsstartpunkte (TSP) der *ssp* Gene *sspA*, *sspF* und *tlp* ermittelt (Abb. 3.3 und Abb. 7.2; Anhang), um davon ausgehend deren Promotorregionen zu bestimmen (Knippers, 2006). Die Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch die *sspA*-Genregion, bei der ein Transkriptionsstartpunkt 41 Bp stromaufwärts vom Startcodon (ATG) nachgewiesen wurde. Die mRNA Region beinhaltet dabei eine Ribosomenbindestelle (RBS) im typischen Abstand von 6-7 Basenpaaren zum ATG Codon (Vyas *et al.*, 2011) und ermittelte -35 und -10 Promotorregionen zeigen hohe Übereinstimmungen zum Vorsporen-spezifische Sigma-Faktor σ^G (Santangelo *et al.*, 1998).



Abb. 3.3: Darstellung des chromosomalen DNA-Lokus von *sspA* in *C. acetobutylicum*. Der offene Leserahmen (grau hervorgehoben) zeigt unterhalb der Sequenz die Aminosäuren im Einbuchstabencode, der Stern (*) markiert das Stopcodon. Der Transkriptionsstartpunkt, 5'-Ende der mRNA, ist durch einen rechtwinkligen Pfeil gekennzeichnet und das entsprechende Nukleotid (G) durch einen Großbuchstaben hervorgehoben. Die -35 und -10 Promotorregion ist eingerahmt und die Shine-Dalgarno-Sequenz (RBS) hervorgehoben. Stromabwärts befindet sich eine palindromische Sequenz eines möglichen Rho-unabhängigen Terminators, illustriert durch gestrichelte aufeinander zulaufende Pfeile.

	(A)	-35	-10	RBS	Start
σ^A	Cac:	TTGACA --16-18--	TATAAT		
σ^G	Bsu:	GAATA --17/18--	CATACTA	6/103-aaaggaggtg-6-ATG	
σ^G	Cac:	GNATR --17/18--	CATNNTA		
σ^F	Cac:	GYWTA --15--	GNRANANTW		
sspA	Cac:	GATTA--17--CA	CAAACCTT	--29--caaggaggtta-7-ATG	
sspB	Cac:	GCATA--17--AC	AAAACTA	--18--ctaggaggtg-6-ATG	
sspD	Cac:	GTATA--17--CA	AAAACCTT	--26--gttggagtgt-6-GTG	
sspF	Cac:	GAATA--17--AG	CAAAATA	--31--tttggaggga-5-ATG	
sspH	Cac:	GCATA--18--AA	GATAATT	--104--tagggaggag-6-TTG	
tlp	Cac:	ACATA--15--	GGAAAAATA	--45--aaaggagatg-6-ATG	
(B)					
sspA	Cac:	TAG-26-	<u>agactgcctcgattgaaaattcaattgaggcagtcttat</u>		
sspB	Cac:	TAA-20-	<u>tttttagtcaaqtqatat</u> -17- <u>atatcatttgactaaca</u>		
sspD	Cac:	TAG-31-	<u>attataaaataaatttattataattgtatgtaaagcatatag</u>		
sspF	Cac:	TGA-21-	<u>ttataataagttqcacatatttatgataaggcttataag</u>		
sspH	Cac:	TAG-16-	<u>taattaaggaaagtcaagatggctcccttaatattata</u>		
tlp	Cac:	TAA-15-	<u>aagaagggtgatttatataaccacccttatttgttaatt</u>		

Abb. 3.4: Promotor- und Terminatorregionen der *ssp* Gene von *C. acetobutylicum*. (A) Promotoren der *ssp* Gene von *C. acetobutylicum* zeigen Vorsporen-spezifische σ^G und σ^F Konsensus-Sequenzen. In den Konsensus-Sequenzen (σ^A Cac, Tomas *et al.*, 2003; σ^G Bsu, Vyas *et al.*, 2011; σ^G/σ^F Cac, Dürre, 2005) bedeuten fettgedruckte Nukleotide 90 % Konservierung und nicht fettgedruckte Nukleotide 50-70 % Konservierung (N=A, C, G, oder T; Y=C, T; R=A, G und W=A, T; Dürre, 2005). (B) Rho-unabhängige Terminatoren stromabwärts der *ssp* Gene. Beide Stämme des Palindroms sind unterstrichen. Die Zahl gibt den Abstand bis zum Stopcodon (in Großbuchstaben) an. Cac, *C. acetobutylicum*; Bsu, *B. subtilis*.

Anhand von Sequenz-Alignments der bestimmten Promotorregionen von *sspA*, *sspF* und *tlp* von *C. acetobutylicum* und denen der SASPs von *B. subtilis* (Nicholson *et al.*, 1989; Cabrera-Hernandez & Setlow, 2000) konnten auch mögliche Promotorregionen für die Gene *sspB*, *sspD* und *sspH* von *C. acetobutylicum* abgeleitet werden (Abb. 7.3; Anhang). Bei den Analysen zeigten die Promotorregionen von *sspA*, *sspB*, *sspD*, *sspF* und *sspH* mindestens 4 bis 5 identische Nukleotide zu der -35 Konsensus-Box von σ^G und 4 bis 7 identische Nukleotide zu der -10 Konsensus-Box von σ^G (Abb. 3.4, A). Nur die Promotorregion des *tlp* Gens zeigte höhere Übereinstimmung zu denjenigen des Sigma-Faktors σ^F (Abb. 7.3; Anhang). Weiterhin befanden sich stromabwärts aller *ssp* Gene Sequenzen, die als dyadrische Symmetrie bezeichnet werden (Connors *et al.*, 1986) und möglicherweise zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur eines Rho-unabhängigen Terminators führen (Abb. 3.4, B).

Zusammenfassend konnte für jedes *ssp* Gen gezeigt werden, dass es als monocistronische genetische Einheit vorliegt, deren Transkription von den Vorsporen-spezifischen Sigma-Faktoren σ^G bzw. σ^F kontrolliert wird.

3.3 Schutzfunktion von SASPs auf Nukleinsäuren

Da wie in der Einleitung erwähnt SASPs praktisch vollständig in Lage sind Sporen-DNA zu schützen (Ge *et al.*, 2011), sollten DNA-Schutzfunktionen für die SASPs von *C. acetobutylicum* untersucht werden. Dazu wurden die sechs *ssp* Gene (Tab. 3.1) in den Expressionsvektor pT-catP::*hydA* (Schulz, 2013) kloniert (3.3.1) und die Proteine heterolog in *E. coli* BL21 exprimiert und aufgereinigt (3.3.2).

3.3.1 Klonierung der *ssp* Gene in den pT-Vektor

Bei dem pT-Vektor (Abb. 7.12) handelt es sich um ein *E. coli* - *C. acetobutylicum* Shuttle-Plasmid für die Expression C-terminaler *Strep-tag*® II Fusionsproteine unter Kontrolle eines konstitutiven Thiolase-Promotors (Girbal *et al.*, 2005). Dazu wurde das entsprechende *ssp* Gen mittels genspezifischer Oligonukleotide (fw_BamHI, rev_Cfr9I; Tab. 7.1) und unter Verwendung genomischer DNA von *C. acetobutylicum* PCR-amplifiziert (2.10.2.1) und nach Hydrolyse mit *Bam*HI und *Cfr*9I in den ebenso behandelten Vektor pT-catP ligiert (2.10.3.3). Dabei erfolgte ein *in frame* Austausch des *hydA* Gens durch das entsprechende *ssp* Gen. Nach einer Transformation in *E. coli* (2.11.1.2) erfolgte eine Selektion positiver Klone auf LB-Festmedium mit Ampicillin, deren Plasmid-Konstrukte isoliert (2.8.5) und verifiziert wurden (Abb. 7.5, A; Anhang). Der Nachweis auf eine korrekte Insertion erfolgte dabei durch DNA Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin).

3.3.2 Heterologe Expression der SASPs in *E. coli*

Zur Gewinnung der einzelnen SASPs wurden die rekombinanten Plasmide (3.3.1) in *E. coli* BL21 elektroporiert (2.11.1.3) und die Zellen wie im Methodenteil unter 2.5.2 beschrieben kultiviert. Dabei war ein Wachstum von *E. coli*-Stämmen, welche SspA, SspB, SspD oder SspF exprimierten durch mögliche toxische Effekte der Proteine negativ beeinflusst (Setlow *et al.*, 1991). Nach einem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (2.14.1) konnten die *Strep-tag* II Fusionsproteine über Affinitätschromatographie (2.14.6) aufgereinigt werden. Um ausreichende Mengen an rekombinantem Protein zu gewährleisten, wurde die Expression und Aufreinigung für jedes SASP vier bis sechsmal wiederholt. Proteinhaltige Elutionsfraktionen wurden gesammelt, gegen *A. dest.* über Nacht bei 4 °C dialysiert (2.14.4) und lyophilisiert (Labovac PK8S). Anschließend wurde jedes SASP in 100 µl TAE-Puffer (2.14.10) gelöst und

bei -20 °C gelagert. Je 3 µg der rekombinanten Proteine wurden in einem SDS-Gradientengel (2.14.8.1) qualitativ analysiert (Abb. 3.5, A). Die zusätzliche Identifikation auf eine Fusion der Proteine mit einem C-terminalen *Strep*-tag II erfolgte im Western Blot (Abb. 3.5, B) mit Hilfe eines *Strep*-tag®-spezifischen Antikörpers (2.14.8.2.1).

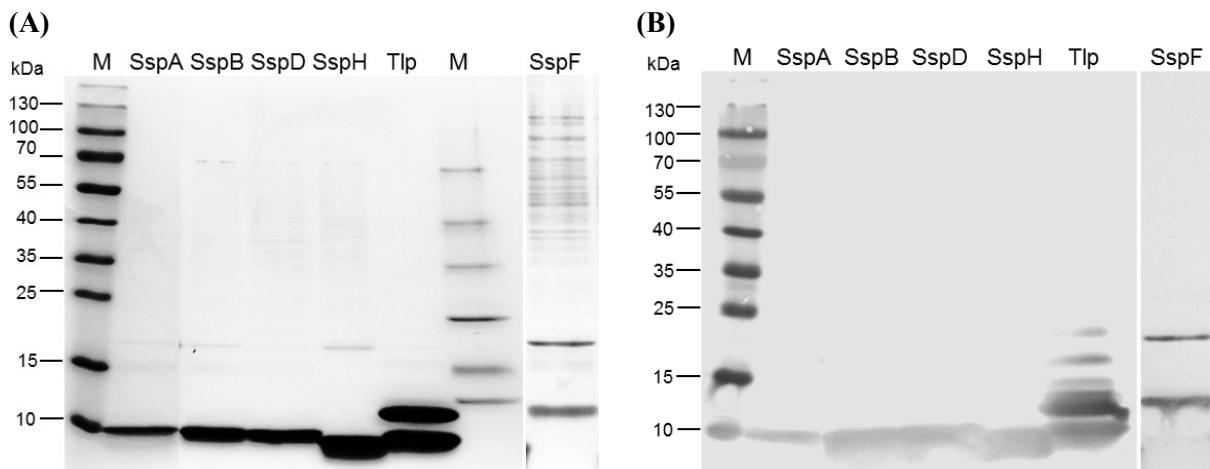


Abb. 3.5: Rekombinante SASPs von *C. acetobutylicum*. (A) Gezeigt ist ein SDS-Gradientengel nach kolloidaler Coomassie-Färbung. Jede Spur beinhaltet 3 µg rekombinantes Protein von SspA (Cac2365), SspB (Cac1522), SspD (Cac1620), SspH (Cac1663), Tlp (Cac1487) oder SspF (Cac2372). (B) Western Blot-Analyse zum Nachweis rekombinanter Fusionsproteine mit Hilfe eines *Strep*-tag®-spezifischen Antikörpers. M, PageRuler Prestained Protein Ladder.

Fünf der SASPs von *C. acetobutylicum* konnten in hoher Reinheit gewonnen werden. Nur SspF wurde in *E. coli* sehr schwach exprimiert. Daher wurde die entsprechende Spur in der Abbildung 3.5 getrennt dargestellt, die diverse verunreinigende Begleitproteine zeigte, unter anderem das Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP; ~16,7 kDa), welches über das *Strep*-tag® System (IBA) mit aufgereinigt wurde. Charakteristisch weisen SASPs ein apparentes Molekulargewicht von etwa 10 kDa auf (Abb. 3.5). Interessanterweise zeigte das Protein Tlp (Cac1487) dabei eine Oligomerisierung (siehe Abb. 7.8, A; Anhang), wobei in der Abbildung 3.5 noch zwei Oligomere zu sehen sind, die offensichtlich selbst unter denaturierenden SDS-Gel-Bedingungen stabil blieben. Auch das homolog aus *C. acetobutylicum* gewonnene Tlp-Protein war zu einer Oligomerisierung befähigt (Abb. 7.8, B; Anhang). Western Blot (Abb. 3.5, B) und MALDI-TOF Analysen bestätigten, dass es sich bei den Oligomeren um das Protein Cac1487 (Tlp) handelt.

3.3.3 Nukleinsäure-Bindungsstudien

Für die Analysen zur Schutzfunktion der SASPs von *C. acetobutylicum* auf Nukleinsäuren (2.14.11) wurden sowohl prokaryotische DNA (chromosomale DNA *C. acetobutylicum*, 2.8.2; Plasmid-DNA *E. coli*, 2.8.5), als auch eukaryotische DNA (*Arabidopsis thaliana*) verwendet. Zudem wurde auch die Bindungseffizienz der SASPs auf Gesamt-RNA von *C. acetobutylicum* (2.8.4) untersucht (Abb. 3.6).

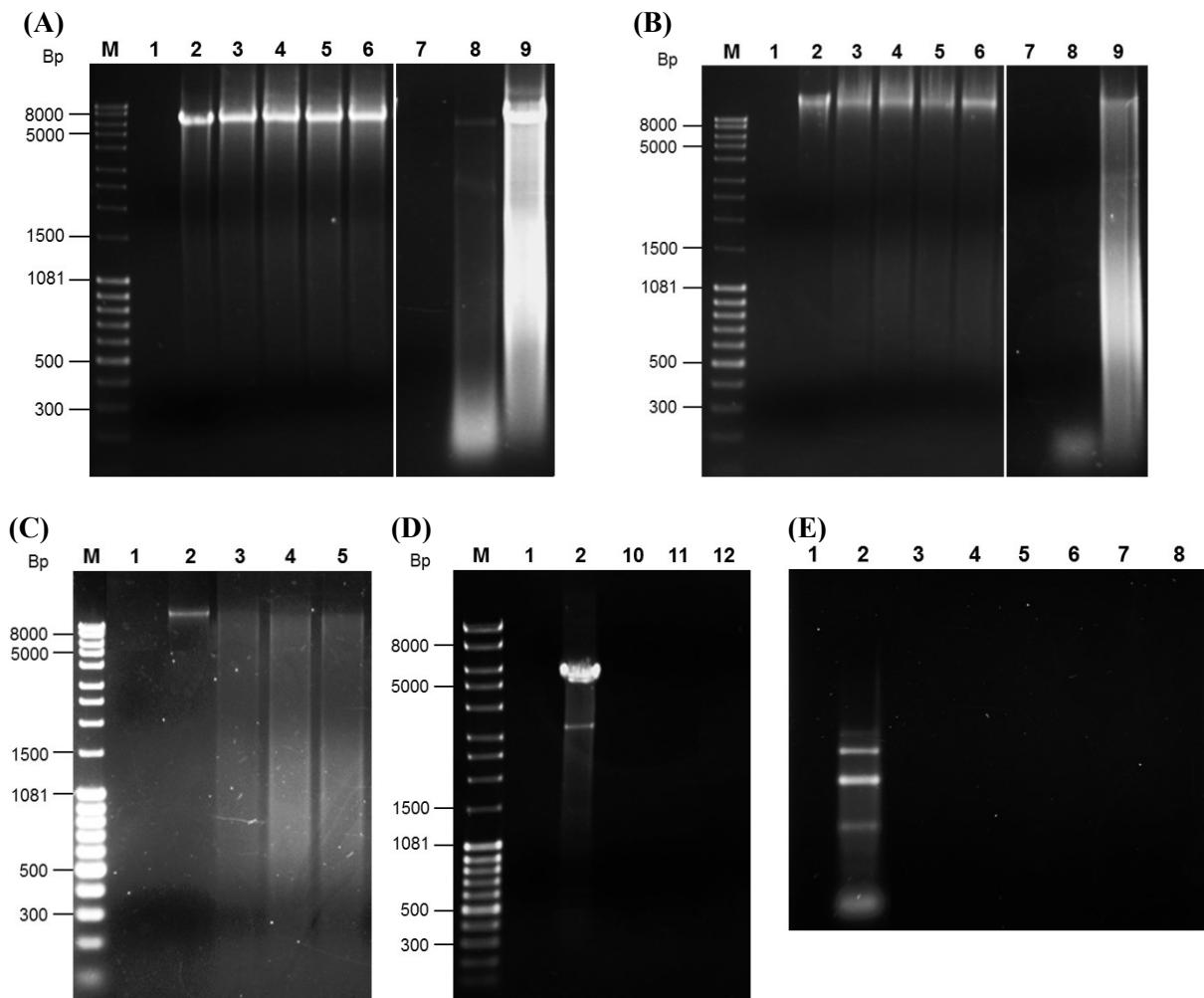


Abb. 3.6: Nukleinsäure-Bindestudien der rekombinanten SASPs von *C. acetobutylicum*. Gezeigt sind 1,5 % [w/v] Agarosegele. (A) und (D) zeigen linearisierte Plasmid-DNA (pT-catP, 1 µg pro Spur), (B) Chromosomale DNA aus *C. acetobutylicum* (1 µg pro Spur) und (C) *Arabidopsis thaliana* DNA (1 µg pro Spur), welche jeweils durch Zugabe von nur DNase I (Positivkontrolle, Spur 1), nur *A. dest.* (Negativkontrolle, Spur 2) oder DNase I und je 3 µg von SspA (Spur 3), SspB (Spur 4), SspD (Spur 5), SspF (Spur 6), SspH (Spur 7), bzw. 10 µg (Spur 8) und 20 µg (Spur 9) von SspH, oder 3 µg (Spur 10), 10 µg (Spur 11) und 20 µg (Spur 12) von Tlp analysiert wurden. (E) *C. acetobutylicum* Gesamt-RNA (1 µg pro Spur), welche entweder nur mit RNase (Positivkontrolle, Spur 1), nur mit *A. dest.* (Negativkontrolle, Spur 2) oder mit RNase und je 3 µg von SspA (Spur 3), SspB (Spur 4), SspD (Spur 5), SspF (Spur 6), SspH (Spur 7) oder Tlp (Spur 8) analysiert wurde. M, MassRuler DNA Ladder Mix.

Bei den DNA-Bindestudien zeigte sich, dass die rekombinanten Proteine SspA, SspB, SspD und SspF in der Lage waren, sowohl linearisierte Plasmid-DNA, als auch chromosomal DNA von *C. acetobutylicum* komplett vor dem Abbau durch DNase I zu schützen (Abb. 3.6, A und B, Spuren 3-6). Hinsichtlich der eukaryotischen DNA von *A. thaliana* wurden die rekombinanten Proteine SspA, SspB und SspD getestet (Abb. 3.6, C, Spuren 3-5), die auch hier in der Lage waren die DNA vor enzymatischem Abbau zu schützen. Eine Schutzfunktion von nativem Gesamtsporenprotein (SspA ~11,15 %) von *C. acetobutylicum* auf Plasmid-DNA konnte ebenfalls bestätigt werden (Abb. 7.7; Anhang). Im Vergleich dazu erwies sich das rekombinante SspH-Protein als nur schwach DNA-bindendes Protein, da höhere DNA-Protein-Verhältnisse eingesetzt werden mussten (1:10 bis 1:20), um einen signifikanten DNA-Schutz zu ermöglichen (Abb. 3.6, A und B, Spuren 7-9). Keine Schutzfunktion konnte für das Tlp-Protein demonstriert werden, auch wenn das DNA-Protein-Verhältnis auf 1:20 erhöht wurde (Abb. 3.6, D, Spur 12). Allen rekombinanten SASPs gemeinsam war, dass sie nicht in der Lage waren *C. acetobutylicum* Gesamt-RNA vor einem Abbau zu schützen (Abb. 3.6, E). Eine eindeutige DNA-Schutzfunktion konnte somit für die Proteine SspA, SspB, SspD und SspF und zu einem geringeren Maße für SspH demonstriert werden, wobei Tlp unter den gegebenen *in vitro* Bedingungen keine DNA-Schutzfunktion aufwies.

3.4 Abbau von SASPs durch Germinationsproteasen

Germinationsproteasen (GPR) gelten als substratspezifische Enzyme, die SASPs abbauen, um Aminosäuren für die sich neu entwickelnde Zelle bereitzustellen (Hayes & Setlow, 2001). Um nachzuweisen, ob die SASPs von *C. acetobutylicum* spezifisch von Germinationsproteasen erkannt und gespalten werden können, wurden GPR-ähnliche Proteasen im Genom von *C. acetobutylicum* identifiziert (3.4.1) und heterolog aus *E. coli* gewonnen (3.4.2).

3.4.1 Identifikation GPR-ähnlicher Proteasen von *C. acetobutylicum*

Nach Nölling *et al.*, (2001) sind im Genom von *C. acetobutylicum* die Gene *cac1275* als „Germination Protease“ und *cac2857* als „GPR related, YyaC ortholog“ annotiert (Tab. 3.2). Genomische „Blast“-Analysen der Proteine (Cummings *et al.*, 2002) gegen *B. megaterium* zeigten dabei für Cac1275 höchste Übereinstimmungen zu einer Sporenprotease (BMD_4557) und für Cac2857 zu einem Sporulationsprotein YyaC (BMD_5262) (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: GPR-ähnliche Proteasen von *C. acetobutylicum*.

ORF	Benennung	Annotierte Funktion ¹	Gen [Bp]	Protein [AS]	MW [kDa]	Homologes Gen ² (Name, ORF, I/Ä [%])
<i>cac1275</i>	<i>gpr</i>	Germination protease	984	327	35,52	Spore protease, BMD_4557 I: 46 / Ä: 68
<i>cac2857</i>	<i>yycA</i>	Spore protease, GPR related, YyaC ortholog	567	188	20,96	Sporulation protein YyaC, BMD_5262 I: 34 / Ä: 52

¹ Nölling *et al.*, 2001; ² Homologes Gen in *B. megaterium* DSM 319 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). ORF, offener Leserahmen; Bp, Anzahl an Basenpaaren (inklusive Stopcodon); AS, Anzahl an Aminosäuren; MW, Molekulargewicht der Proteine in Kilotonnen [kDa]; I, Identität; Ä, Ähnlichkeit.

Germinationsproteasen gehören zur Klasse atypischer Aspartat-Proteasen (Carroll & Setlow, 2005), deren Aspartatreste essentiell für deren Autoprozessierung (3.4.4) und den Abbau von SASPs (3.4.5) sind. Als weitere Klasse GPR-ähnlicher Proteasen werden YyaC-Protein eingestuft, bei denen die essentiellen Aspartatreste zu 100 % konserviert sind (Abb. 3.7) (Carroll, 2008), aber diese Proteasen mit einem apparenten Molekulargewicht von ~21 kDa deutlich kleiner sind als GPR (~35,5 kDa) (Tab. 3.2).

GPR-typische Sekundärstrukturen bestehen aus insgesamt neun α-Helices und acht β-Faltblattanordnungen (Ponnuraj *et al.*, 2000). Die Abbildung 3.7 zeigt vergleichend konservierte, zentrale Bereiche von GPR und YyaC-Proteasen aus *C. acetobutylicum* und *B. megaterium*.

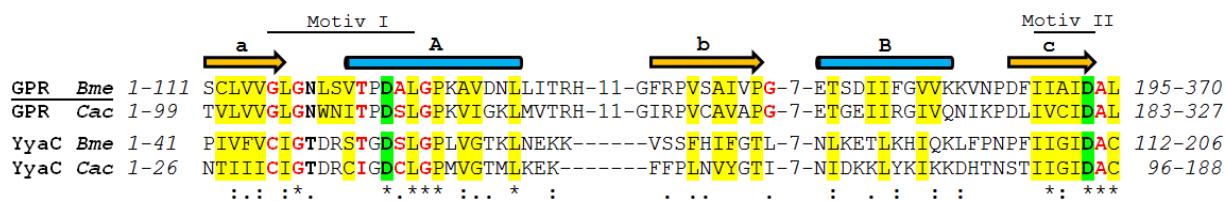


Abb. 3.7: Alignment von GPR und YyaC-Proteasen aus *C. acetobutylicum* und *B. megaterium* (nach Pei & Grishin, 2002; mod.). Die GPR mit bekannter Struktur ist unterstrichen. Essentielle und katalytische Aspartatreste (D) sind grün hervorgehoben, konservierte hydrophobe AS gelb und konservierte kleine AS rot. Sekundäre Strukturelemente sind oberhalb der Sequenz (α-Helices als gelbe Pfeile und β-Faltblattstrukturen als blaue Balken) ausgewiesen. *, 100 % konservierte AS; :, AS mit sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften und ., AS mit geringer Ähnlichkeit. *Cac*, *C. acetobutylicum*; *Bme*, *B. megaterium*.

Die konservierten Aminosäurereste für die Ausbildung einer möglichen GPR-typischen Sekundärstruktur verdeutlichen die hohen Übereinstimmungen zwischen GPR und YyaC Proteasen. Die zentralen Kernregionen beinhalten dabei die essentiellen Aspartatreste (D, grün; Abb. 3.7), welche bei beiden Proteasen zu 100 % konserviert sind. Zudem sind weitere

hydrophobe und kleine Aminosäurereste bei GPR und YyaC konserviert. Somit kann aufgrund der *in silico* Analysen sowohl Cac1275 der Klasse der GPR, als auch Cac2857 der Klasse der YyaC-Proteasen zugeordnet werden.

3.4.2 Klonierung von *cac1275 (gpr)* und *cac2857 (yyaC)* in den pT-Vektor

Zur Gewinnung der Proteasen Cac1275 und Cac2857 wurden die entsprechenden Gene mit den Oligonukleotiden fw_BamHI und rev_Cfr9I (Tab. 7.1) und unter Verwendung genomischer DNA von *C. acetobutylicum* als Matrize PCR-amplifiziert (2.10.2.1). Nach einer Hydrolyse (BamHI, Cfr9I), erfolgte die Ligation in den Expressionsvektor pT-catP (2.10.3.3) und anschließende die Transformation in *E. coli* (2.11.1.2), wobei eine Selektion auf LB-Festmedium mit Ampicillin erfolgte. Von den resistenten Klonen wurden die Plasmide isoliert (2.8.5) und auf eine korrekte Insertion mittels Kontrollrestriktion (Abb. 7.5, B; Anhang) und DNA Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) verifiziert.

3.4.3 Expression von Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC) in *E. coli*

Die Klonierungen in den pT-catP Vektor (Abb. 7.12) ermöglichen eine Fusion der Proteasen mit einem C-terminalen *Strep-tag*® II zu ihrer selektiven Aufreinigung. Deren Überexpression erfolgte dabei in *E. coli* DH5 α (2.5.2). Analog zu den SASPs (3.3.2) wurde zur Erhöhung der Protein ausbeuten, die Expression und Aufreinigung vier bis sechsmal wiederholt und die Protein-Eluate einer Dialyse und Lyophilisierung unterzogen (3.3.2), bevor sie in ~200 μ l *A. dest.* gelöst und umgehend für Untersuchungen (2.14.12, 2.14.13) verwendet wurden. Die Reinheit der rekombinanten *Strep-tag*-Fusionsproteine Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC) ist in der Abbildung 3.9 (Spuren 1 und 3) (3.4.4) dargestellt.

3.4.4 Autoprozessierungsreaktion von Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC)

Wie in der Einleitung erläutert, werden Germinationsproteasen als inaktive Vorstufe gebildet und später durch Autoprozessierung aktiviert, indem ein N-terminales Propeptid abgespalten wird (Hackett & Setlow, 1983). Dabei erfolgt die Autoprozessierungsreaktion im Falle von GPR-Proteinen an einer konservierten Sequenz D↓LAVE (Sanchez-Salas & Setlow, 1993), die bei Cac1275 (GPR) ebenfalls konserviert ist und dementsprechend an dem Aspartatrest D7 erfolgen müsste (Abb. 3.8). Da noch keine Untersuchungen zu YyaC-Aktivitäten vorliegen, gibt es bisher auch keine Erkenntnisse über mögliche Aktivierungsschnittstellen. Sequenz-

vergleiche verschiedene YyaC-Proteasen aus *Clostridium* und *Bacillus* dieser Arbeit zeigten jedoch, dass keine konservierten Sequenzen für eine mögliche Autoprozessierungsreaktion vorhanden sind (siehe Abb. 7.10; Anhang). Wenn allerdings auch bei YyaC-Proteinen eine Autoprozessierung von einem Aspartatrest abhängig sein sollte, wären mögliche Kandidaten D26, D27 oder D37 (Abb. 3.8).

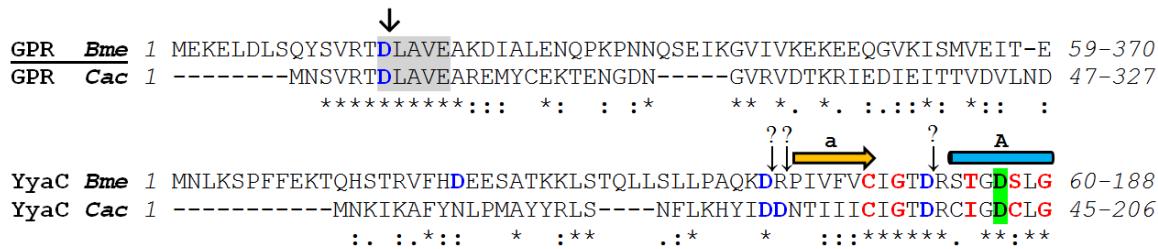


Abb. 3.8: N-terminale Aktivierungssequenzen bei GPR und mögliche Sequenzen bei YyaC. Die konservierte GPR Sequenz (D↓LAVE) ist grau hervorgehoben. Am Aspartatrest (D, blau) erfolgt die Autoprozessierung, gekennzeichnet durch den senkrechten Pfeil. Mögliche Aspartatreste in YyaC-Proteasen für eine Autoprozessierung sind in blau und durch einen Pfeil mit Fragezeichen gekennzeichnet. Der gelbe Pfeil und der blaue Balken stellen vorhergesagte Sekundärstrukturen dar (siehe Abb. 3.7). *, 100 % konservierte AS; :, AS mit sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften und ., AS mit geringer Ähnlichkeit. Cac, *C. acetobutylicum*; Bme, *B. megaterium*.

Um eine Autoprozessierung bei Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC) untersuchen zu können, wurde jeweils 3 µg rekombinantes Protein (3.4.3) über Nacht in einem Autoprozessierungs-Puffer inkubiert (2.14.12) und anschließend in einem SDS-Gradientengel (2.14.8.1) analysiert (Abb. 3.9). Der Nachweis auf N-terminal abgespaltete Propeptide erfolgte dabei im Western Blot mit Hilfe eines gegen den C-terminalen *Strep*-tag der Fusionsproteine gerichteten Antikörpers (Abb. 3.9, B, Spuren 2 und 4). Als Kontrolle dienten rekombinante Proteine, die nur in *A. dest.* gelöst waren (Abb. 3.9, Spuren 1 und 3).

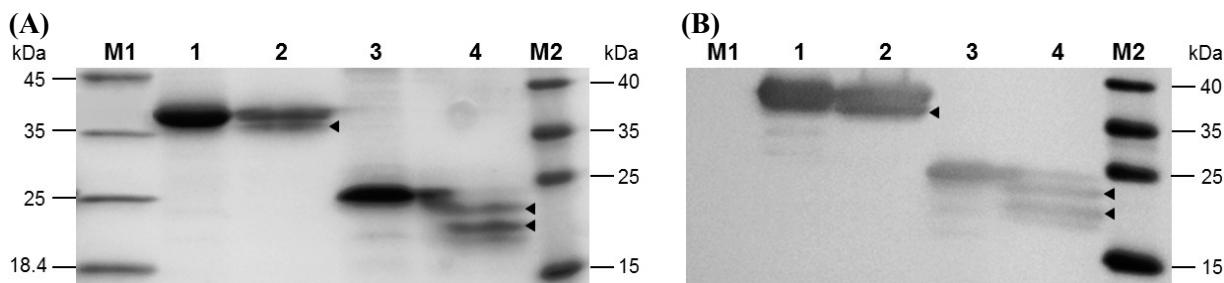


Abb. 3.9: Autoprozessierung von Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC) von *C. acetobutylicum*. (A) Gezeigt ist ein SDS-Gradientengel (10-20 %) nach kolloidaler Coomassie-Färbung. Die Autoprozessierungsreaktion von Cac1275 resultierte in einer kleineren Proteinbande von ~35.5 kDa (Spur 2, ▲) im Vergleich zur Kontrolle mit ~36.5 kDa (Spur 1, 3 µg GPR in *A. dest.*) und diejenige von Cac2857 zu zwei kleineren Proteinbanden von ~20 kDa und ~18 kDa (Spur 4, ▲) im Vergleich zur Kontrolle mit ~22 kDa (Spur 3, 3 µg YyaC in *A. dest.*). (B) Nachweis N-terminal abgespalteter Propeptide (Spur 2, 4; ▲) durch Einsatz eines gegen den C-terminalen *Strep*-tag gerichteten Antikörpers im Western Blot. M1/M2, Un-/Prestained Protein Ladder.

Für beide Proteasen ließ sich eine Autoprozessierung unter den *in vitro* Bedingungen nachweisen. Bei Cac1275 (GPR) kam es dabei zur Abspaltung eines N-terminalen Propeptids von ~1 kDa (Abb. 3.9, Spur 2) und bei Cac2857 zur Abspaltung von zwei N-terminalen Propeptiden von ~2 kDa und ~4 kDa (Abb. 3.9, Spur 4). Dabei stimmt die experimentell ermittelte Größe des ~1 kDa -Propeptids von Cac1275 mit dem zu erwartenden Propeptid von ~0,7 kDa (D7, ohne M1, Abb. 3.8) gut überein. Bei Cac2857 (YyaC) traten zwei Propeptide (~2 kDa und ~4 kDa) auf. Möglichen Asparatreste für eine Autoprozessierung wären D26 bzw. D27 (~3,12 - 3,24 kDa, ohne M1) oder D37 (~4,28 kDa, ohne M1) (Abb. 3.8) und könnten mit den experimentell ermittelten Propeptiden übereinstimmen.

3.4.5 Spaltung von SASPs durch Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC)

Da die Proteasen Cac1275 und Cac2857 zur Autoprozessierung befähigt waren (3.4.4), stellte sich die Frage, ob eine GPR-spezifische Proteaseaktivität nachzuweisen ist. Für die Analysen der Substratspezifität (2.14.3) wurde extrahiertes Gesamtprotein aus *C. acetobutylicum* Endosporen (2.14.4), als auch ein alternatives Substrat, in diesem Fall die Vinylacetyl-CoA Delta-Isomerase von *C. beijerickii* (zur Verfügung gestellt von Markus Klipp, Abteilung Mikrobiologie, Universität Rostock), verwendet. Die Aktivitätsbestimmungen (SA) der Proteasen (2.14.14) erfolgten anhand der rekombinanten Substrate SspB und SspD (3.3.2), welche in ausreichenden Mengen für die Analyse gewonnen werden konnten. Die Untersuchungen verliefen dabei nach einer modifizierten Methode von Carroll (2008), indem statt direkt aktiven Proteasen, die Zymogene von GPR und YyaC eingesetzt wurden. Folglich mussten die Zymogene erst in einem Autoprozessierungs-Puffer (2.14.2) aktiviert werden und konnten dann je nach Aktivität die Substrate spalten.

GPR erkennen und spalten α/β -Typ SASPs an einer hochkonservierten Pentapeptidsequenz E↓IASE (Setlow, 1988). Bis auf Tlp, sind die SASPs von *C. acetobutylicum* für diese Pentapeptidsequenz konserviert (Abb. 3.1). Zur Aktivitätsbestimmung, wurde Cac1275 (GPR) und Cac2857 (YyaC) zeitabhängig mit SspB oder SspD inkubiert (Abb. 3.10, A, B). Anhand einer ersten Spaltung der SASPs konnte daraus die spezifische Aktivität (SA) (2.14.14) berechnet werden (Tab. 3.3). Die Substratspezifitäten der Proteasen für extrahiertes Gesamtprotein aus *C. acetobutylicum* Endosporen sind in der Abbildung 3.10 (C) und für das alternative Substrat der Vinylacetat-CoA Delta-Isomerase in der Abbildung 3.10 (D) dargestellt.

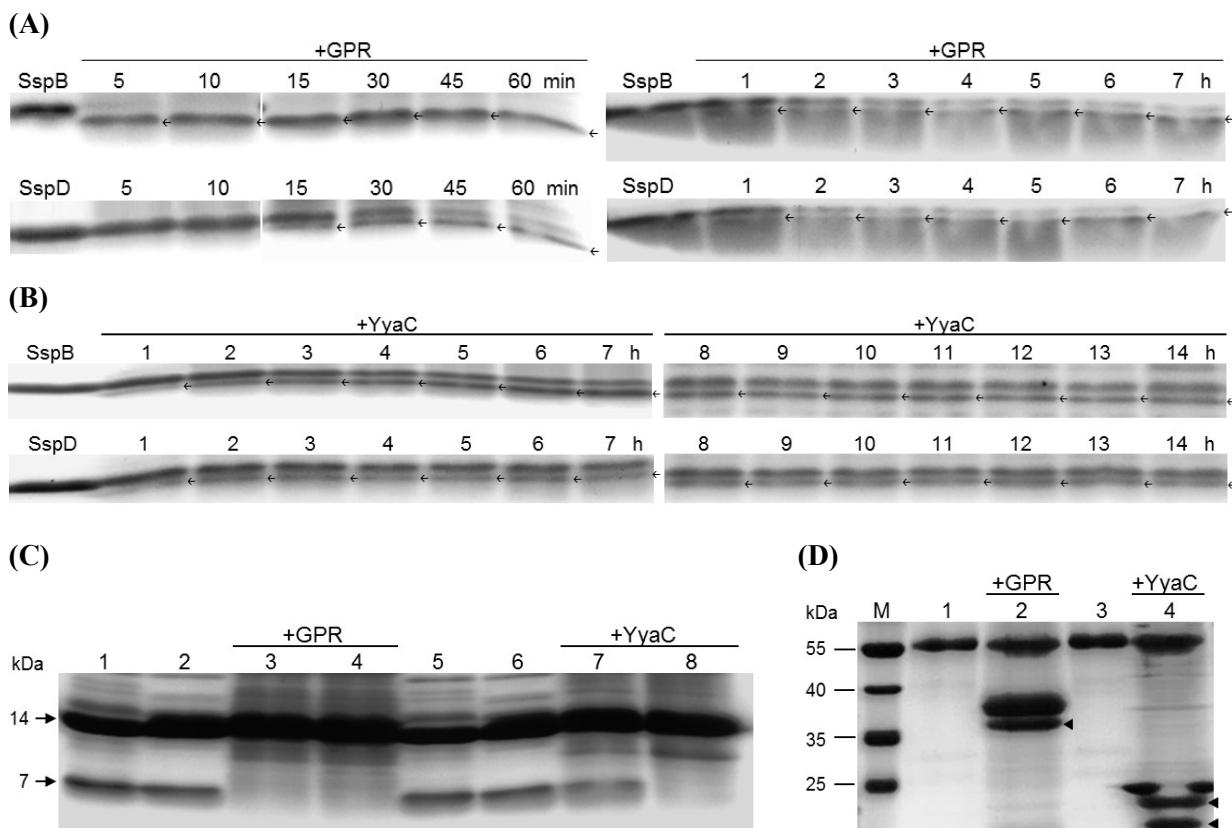


Abb. 3.10: Proteolytische Spaltung rekombinanter SASPs, sowie Spezifitäten der GPR und YyaC von *C. acetobutylicum*. Gezeigt sind SDS-Gradientenäge nach kolloidaler Coomassie-Färbung. (A) Zeitabhängige Spaltungen von SspB und SspD (je 2 µg) durch GPR. In einem Verhältnis von 1:5 (SASP:GPR) erfolgte eine Inkubation für 5 - 60 min und 1-7 h. Ein erstes Spaltprodukt, gekennzeichnet durch den Pfeil (←), konnte für SspB nach 5 min und für SspD nach 15 min detektiert werden. (B) Zeitabhängige Spaltungen von SspB und SspD durch YyaC. In einem Verhältnis von 1:6 (SASP:YyaC) erfolgte eine Inkubation für 1 - 14 h. Erste Spaltprodukte von SspB und SspD konnten jeweils nach 1 h nachgewiesen werden, repräsentiert durch den Pfeil (←). (C) Spezifischer Abbau in extrahierten Sporenproteinen. Gesamtprotein (4 µg; Spur 1, 5) wurde nur in Autoprozessierungs-Puffer (Spur 2, 6) und in Puffer mit GPR (Verhältnis 1:5; Extrakt:Protease) für 12 h und 24 h (Spur 3, 4) bzw. in Puffer mit YyaC (Verhältnis 1:5; Extrakt:Protease) für 12 h und 24 h (Spur 7, 8) inkubiert. Ein selektiver Abbau der ~7 kDa Proteinbande (SspA) konnte für beide Proteasen demonstriert werden. Eine nicht-spezifische Proteaseaktivität in den Extrakten konnte nicht ermittelt werden (Spur 2, 6). (D) Inkubation von GPR und YyaC mit alternativen Substraten. Vinylacetyl-CoA Delta-Isomerase (2 µg, ~55 kDa, Spur 1, 3) wurde in einem Verhältnis von 1:5 mit GPR (Spur 2) oder mit YyaC (Spur 4) in Autoprozessierungs-Puffer für 24 h bei 37 °C inkubiert. Ein Abbau konnte nicht nachgewiesen werden. Der Pfeil (◀) gekennzeichnet aktivierte verkleinerte Proteinbanden der Proteasen. M, Prestained Protein Ladder. (n=3)

Beide Proteasen zeigten GPR-ähnliche Aktivitäten (Abb. 3.10, A, B, C) und alternative Substrate keine Form von Abbau (Abb. 3.10, D). Die Protease Cac1275 (GPR) war unter den gegebenen *in vitro* Bedingungen (2.14.14) in der Lage die Substrate SspB nach 5 min und SspD nach 15 min zu spalten (Abb. 3.10, A). Wird dabei die spezifische Aktivität der GPR zu SspB mit SA = 2,4 auf 100 % gesetzt (Tab. 3.3), so ergibt sich eine relative Substratspezifität von GPR zu SspD von 33,33 %. Die Protease Cac2857 (YyaC) zeigte nach etwa einer Stunde eine Spaltung von SspB, als auch von SspD (Abb. 3.10, B), so dass sich im Vergleich zu der

GPR von *C. acetobutylicum* für die YyaC eine relative Substratspezifität von 6,94 % ermittelt werden konnte (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Substratspezifitäten der GPR und YyaC von *C. acetobutylicum*.

Substrat	Spezifische Aktivität von GPR ¹	Spezifische Aktivität von YyaC ¹
SspB	2,4 (100) ²	0,167 (6,94)
SspD	0,8 (33,33)	0,167 (6,94)

¹ Die Spezifische Aktivität (SA) wurde nach Carroll (2008), (2.14.14) bestimmt. Werte in Klammern geben die relative Substratspezifität im Verhältnis zur GPR mit 100 % an. ² SA zu SspB wurde auf 100 % gesetzt.

Eine Spaltung der Substrate durch GPR erfolgte demnach 5-14x schneller, als durch die YyaC. Ein weiterer Hinweis der Funktion von GPR und YyaC als spezifische Germinationsproteasen lieferten Versuche in denen in extrahiertem Gesamtsporenprotein ausschließlich die Proteine einer ~7 kDa Bande abgebaut wurden (Abb. 3.10, C). Die Extrakte selbst wiesen dabei keine Proteaseaktivität auf (Abb. 3.10, C, Spur 2 und 6), weshalb der Abbau spezifisch auf die Proteasen GPR und YyaC zurückzuführen war (Abb. 3.10, C, Spuren 3 - 4 und 7 - 8).

Die ~7 kDa Proteinbande wurde mittels MALDI-TOF MS (2.14.9) quantitativ als SspA identifiziert (Abb. 7.1 und Tab. 7.4; Anhang) und untermauerte damit die SASP-Spezifität beider Proteasen. Dementsprechend konnten alternative Substrate, wie das hypothetische Protein Cac3357 in den Sporenextrakten (Abb. 3.10, C, ~14 kDa), oder die Vinylacetyl-CoA Delta Isomerase (Abb. 3.10, D, ~55 kDa) von den Proteasen nicht abgebaut werden. Die alternativen Substrate zeigten dabei keine Übereinstimmung zu SASPs („Blast“-Analysen).

3.5 Erzeugung von SASP-Insertionsmutanten von *C. acetobutylicum*

Das ClosTron® System (Heap *et al.*, 2007, 2010) dient der gezielten Mutagenese von Genen unter Einsatz eines mobilen Gruppe II Introns. Im Zuge meiner Diplomarbeit (Wetzel, 2012) wurden nach dieser Methode vier SASP-Insertionsmutanten von *C. acetobutylicum* generiert. Dabei handelt es sich um die Stämme *cac2365::int(103a)*, *cac1522::int(120s)*, *cac1620::int(41s)* und *cac2372::int(43a)*, (Tab. 2.1). Die Mutagenese von *cac1487* erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Frau Stecker (*cac1487::int(39s)*; Stecker, 2012).

Aufgrund von *in silico* Analysen (3.1) und biochemischer Charakterisierungen der Proteine (3.3, 3.4) wurden die Insertionsstämme in dieser Arbeit als *sspA::int (cac2365)*, *sspB::int*

(*cac1522*), *sspD*::int (*cac1620*), *sspF*::int (*cac2372*) und *tlp*::int (*cac1487*) bezeichnet (3.1). Zudem kristallisierte sich ein weiteres mögliches SASP, Cac1663, heraus, welches durch *in silico* Analysen der SspH-Familie zugeordnet (3.1) und auf proteinbiochemischer Ebene als SASP bestätigt werden konnte (3.3). Um eine vergleichende Funktionsanalyse aller SASPs in *C. acetobutylicum* durchführen zu können, wurde auch das *sspH*-Gen (*cac1663*) mit Hilfe des ClosTron® Systems inaktiviert. Für die Insertionsmutagenese (2.12) wurde ein Gruppe II Intron an das Gen *cac1663* in einer SOE-PCR (2.10.2.2) mit den Oligonukleotiden IBS_sspH_53s, EBS1d_sspH_53s, EBS2_sspH_53s und EBS Universal (Tab. 7.1; Anhang) angepasst. Dabei wurde unter Verwendung des Vektors pMTL007 als Matrize ein 350-Bp-Fragment amplifiziert. Nach einer Hydrolyse mit *HindIII* und *Bsp1407I* wurde das Fragment in den Intron-kodierenden Vektor pMTL007C-E2 (Abb. 7.13; Anhang) ligiert (2.10.3.3) und in *E. coli* transformiert (2.11.1.2). Eine Selektion positiver Klone erfolgte auf LB-Festmedium mit Chloramphenicol und X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion. Der Austausch des pMTL007C-E2 *lacZ'* Gens durch das 350-Bp-Fragment führte zu einem Funktionsverlust der β-Galaktosidase in den Transformanten und somit zu weißen Klonen. Deren rekombinante Plasmide wurden isoliert (2.8.5) und durch Kontrollrestriktion (*HindIII*, *Bsp1407I*) und einer anschließenden Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) verifiziert. Erfolgreiche Konstrukte wurden *in vivo* methyliert (*E. coli* ER2275, 2.11.1.3) und in *C. acetobutylicum* ATCC 824 elektroporiert (2.11.2). Eine Selektion der Klone erfolgte auf RCA-Festmedium mit Thiamphenicol, wovon eine resistente Kolonie in 500 µl CGM-Medium für 4 h inkubiert und anschließend auf RCA-Festmedium mit Erythromycin selektiert wurde. Die Analyse auf eine Integration des Gruppe II Introns in das Genom von *C. acetobutylicum* erfolgte durch PCR. Zunächst wurde der Nachweis durch eine Gen-Intron PCR unter Verwendung der Primer (*sspH_fw*, EBS universal; Tab. 7.1) erbracht (Abb. 3.11, A). Der spezifische Nachweis für die Integration in das *sspH*-Gen erfolgte in einer Gen-Gen PCR, wobei der Leserahmen von *sspH* (177 Bp) um das Gruppe II Intron (1800 Bp) vergrößert war (~2000 Bp Fragment), (Abb. 3.11, B). Zudem erfolgte eine Southern Blot Analyse (Abb. 3.12), um eine einmalige und korrekte Integration des Introns zu bestätigen. Dafür wurde genomische DNA vom *C. acetobutylicum* Wildtyp und der *sspH* Mutante verwendet und die korrekte Insertion sowohl mit einer Gen-spezifischen, als auch ErmRAM-spezifischen Sonde verifiziert. Bei der Hydrolyse der chromosomal DNA mit *MspI* und unter Verwendung der Gen-spezifischen Sonde war beim Wildtyp ein 5679 kBp Fragment und bei der *sspH* Mutante ein 7479 kBp Fragment zu erwarten (Abb. 3.12).

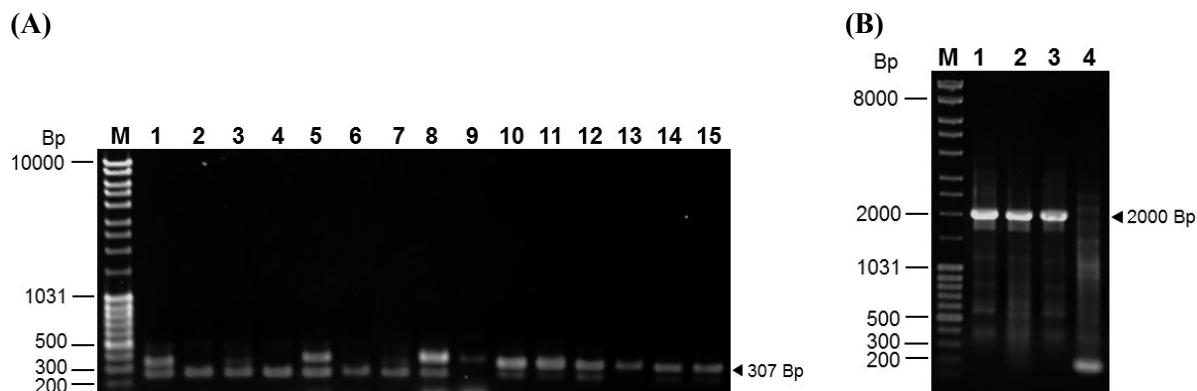


Abb. 3.11: Nachweis der Integration des Gruppe II Introns in das *sspH*-Gen mittels PCR. Gezeigt sind 0,8 % [w/v] Agarosegele. (A) Gen-Intron PCR. Durch die Primer *sspH*_fw und EBS Universal (Tab. 7.1) wurde ein 307-Bp-Fragment (Spuren 10-15) amplifiziert. (B) Gen-Gen PCR. Die Integration des Introns (~1800 Bp) in den Leserahmen *sspH* (177 Bp, Spur 4, WT) führte unter Verwendung von *sspH*_fw und *sspH*_rev zur Amplifikation eines ~2000 Bp Fragments (Spuren 1-3, *sspH* Klone 10, 11, 13). M, MassRuler DNA Ladder Mix.

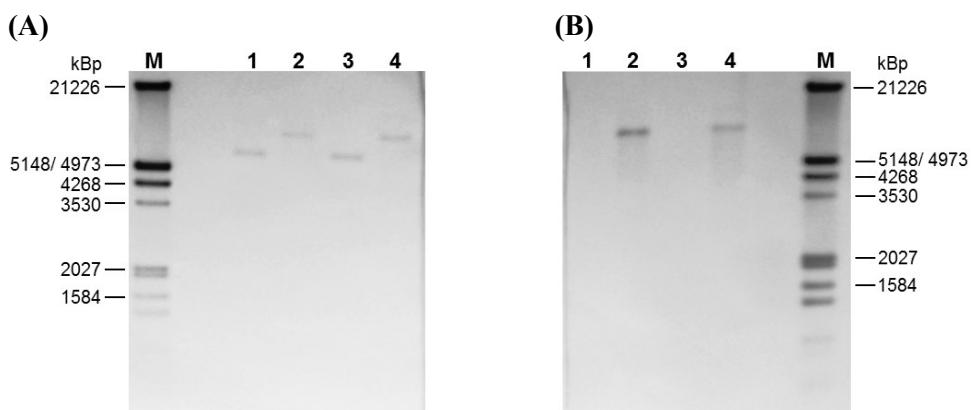


Abb. 3.12: Verifikation der *sspH*-Insertionsmutante durch Southern Hybridisierung. Genomische DNA (500 ng) vom *C. acetobutylicum* Wildtyp und der *sspH*::int(53s) Mutante wurden mit *MspI* hydrolysiert und in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran, erfolgte der Nachweis mit einer Gen-spezifischen (A) und einer ErmRAM-spezifischen Sonde (B). Spuren 1,3: Wildtyp; Spur 2: *sspH*::int Klon 10, Spur 4: *sspH*::Int Klon 13; M, DNA Molecular Weight Marker III.

3.5.1 Wachstum der *sspH* Mutante

Die wachstumsphysiologische Charakterisierung der *sspH* Mutante vergleichend zum Wildtyp von *C. acetobutylicum* erfolgte in 200-ml-MS-MES-Kulturen (2.5.1.1). Dabei zeigten sich hinsichtlich des Wachstums und der finalen Fermentationsprodukte keine Unterschiede (Abb. 3.13). In der exponentiellen Wachstumsphase erreichte der Wildtyp eine spezifische Wachstumsrate (2.6.2) von $0,121 \text{ h}^{-1}$ und die *sspH* Mutante von $0,125 \text{ h}^{-1}$. Nach ca. 58 h setzte die stationäre Wachstumsphase ein, wobei der Wildtyp eine maximale optische Dichte von 3,2 nach 62 h und die *sspH* Mutante von 4,0 nach 80 h aufwies. Anschließend kam es zu einem Rückgang der optischen Dichte, so dass nach 120 h die OD₆₀₀ beim Wildtyp bei 3,10 und bei

der *sspH* Mutante bei 2,64 lag. In Bezug auf den pH-Wertverlauf gab es ebenfalls kaum Unterschiede. Nach einem anfänglichen pH-Wert von 5,2 sank dieser aufgrund der Säureproduktion beim Wildtyp auf 4,58 und bei der *sspH* Mutante auf 4,69. Mit dem Eintritt in die stationäre Phase und der metabolischen Lösungsmittelproduktion kam es zu einem leichten Anstieg des pH-Werts auf 4,67 beim Wildtyp bzw. 4,74 bei der *sspH* Mutante. Anschließend stagnierte der pH-Wert und blieb bei einem Wert um 4,62 bzw. 4,68 konstant. Hinsichtlich der finalen Fermentationsprodukte, die auf eine OD₆₀₀ von 1 normalisiert wurden, konnten für den Wildtyp und für die *sspH* Mutante ähnliche Werte an Aceton (31,1 mM; 32,74 mM), Butanol (45,96 mM; 53,16 mM) und Ethanol (12,59 mM; 15,24 mM) gemessen werden (Abb. 3.13, B).

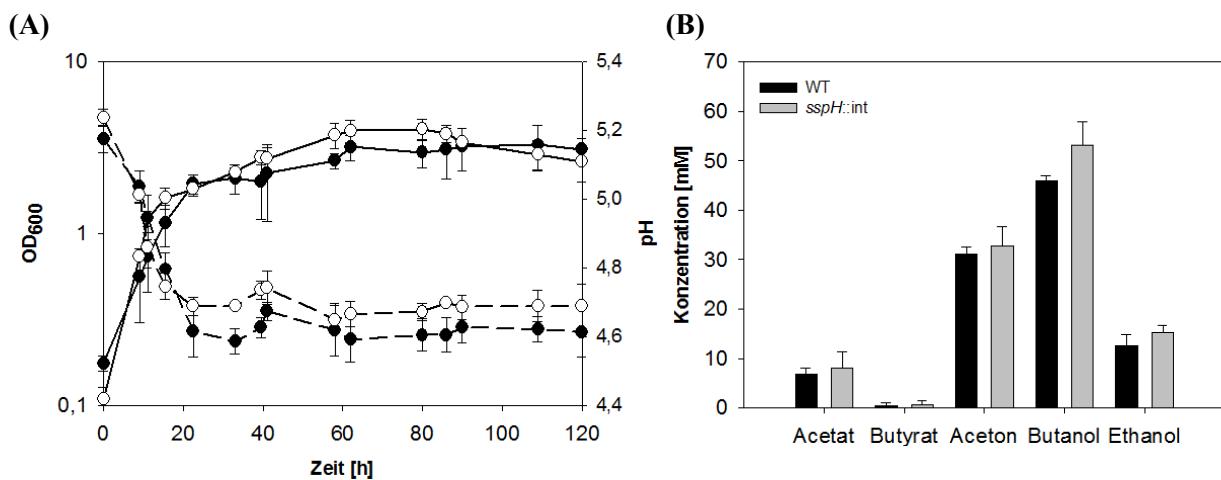


Abb. 3.13: Wachstumsanalyse und Fermentationsprodukte der *sspH* Mutante von *C. acetobutylicum* im Vergleich zum Wildtypstamm. (A) Während des Wachstums in 200-ml-MS-MES-Kultur wurden die optische Dichte (WT, ●—●; *sspH*::int, ○—○) und der pH-Wert (WT, -●---; *sspH*::int, -○---) gemessen. (B) Die Fermentationsprodukte wurden nach 120 h gaschromatographisch bestimmt und sind auf eine OD-Einheit von 1 normalisiert. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

3.5.2 Sporenbildung der SASP-Mutanten von *C. acetobutylicum*

Für eine Analyse der Sporenbildung bei den SASP-Insertionsmutanten und dem Wildtyp von *C. acetobutylicum* wurden aus 200-ml-MS-MES-Kulturen alle 24 h die lichtbrechenden und freien Endosporen bestimmt (2.6.3). Eine freie Spore liegt dabei frei im Medium vor und ist nicht mehr von einer Mutterzelle umgeben. Der Verlauf der Sporenbildung über 120 h ist in der Abbildung 3.14 dargestellt.

Demnach zeigten nach 48 h sowohl der Wildtyp, als auch die Mutantenstämme der Gene *sspB*, *sspH* und *tlp* erste freie Sporen, wobei *sspH*::int mit $1,81 \times 10^6$ Sporen/ml die höchste Anzahl

und *sspB*::int mit $1,39 \times 10^5$ Sporen/ml die geringste Anzahl an Sporen aufwies. Nach 72 h bildeten auch die SASP-Mutanten der Gene *sspA*, *sspD* und *sspF* erste freie Sporen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte *tlp*::int mit $9,71 \times 10^6$ Sporen/ml die höchste Anzahl und *sspF*::int mit $4,86 \times 10^5$ Sporen/ml die geringste Anzahl an Sporen. Am Ende der Kulturführung (120 h) waren alle Stämme in der Lage eine ähnliche Anzahl an Gesamtsporen ohne signifikante Unterschiede ($p \geq 0,05$) auszubilden. Dabei lag die Anzahl an Sporen bei den Mutanten von *sspA*, *sspD* und *sspF* bei ca. $4,9 \times 10^6$ Sporen/ml und beim Wildtyp und den Mutanten von *sspB*, *sspH* und *tlp* bei ca. $2,7 \times 10^7$ Sporen/ml.

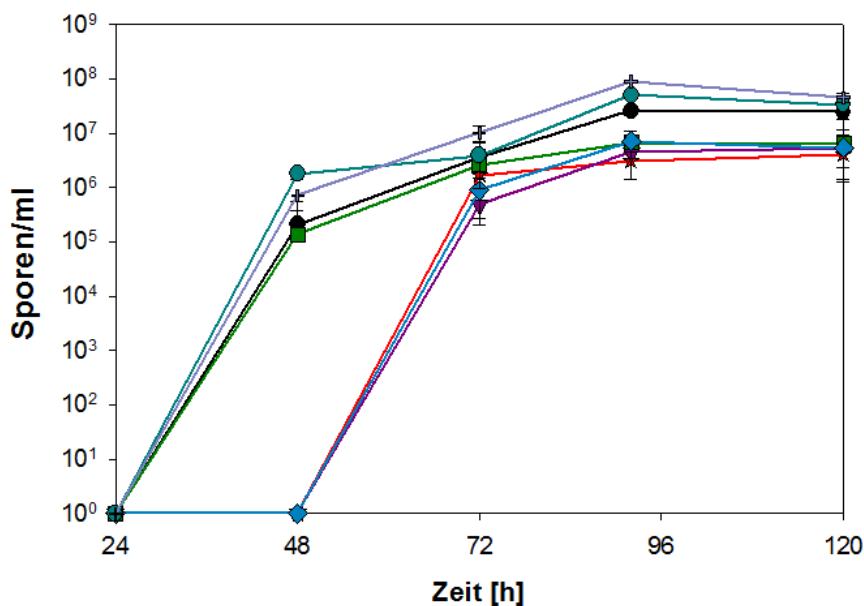


Abb. 3.14: Bildung freier Sporen bei den SASP-Mutanten und beim Wildtyp von *C. acetobutylicum* über 120 h. Alle 24 h wurde in 200-ml-MS-MES-Kulturen die Anzahl an freien Sporen lichtmikroskopisch bestimmt. Gezeigt ist die Anzahl an Sporen/ml für den Wildtyp (●), die *sspA* Mutante (★), die *sspB* Mutante, (■), die *sspD* Mutante (◆), die *sspF* Mutante (▼), die *sspH* Mutante (●) und für die *tlp* Mutante (✚). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

3.5.3 Sporenkeimung der SASP-Mutanten auf Festmedium

Die nach 120 h gebildeten Sporen des Wildtyps und der SASP-Mutanten von *C. acetobutylicum* (3.5.2) wurden von restlichen vegetativen Zellen mit Hilfe eines Percoll-Gradienten abgetrennt (2.16.2.1), auf eine Konzentration $4,0 \times 10^6$ Sporen/ml eingestellt und in Hitzestressexperimenten bei 80°C untersucht (2.16.4.2). Dabei konnten, durch konstante Temperatureinwirkung, die dezimalen Reduktionszeiten (2.6.4) für die Sporen der einzelnen Stämme ermittelt werden (Tab. 3.4). Die Analysen zur Hitzeresistenz der Sporen (Abb. 3.15)

erfolgten dabei auf RCA-Festmedium mit Hilfe eines Sporen-Assays (2.16.4.1). Als Kontrolle (Zeitpunkt t_0) dienten unbehandelte Sporen.

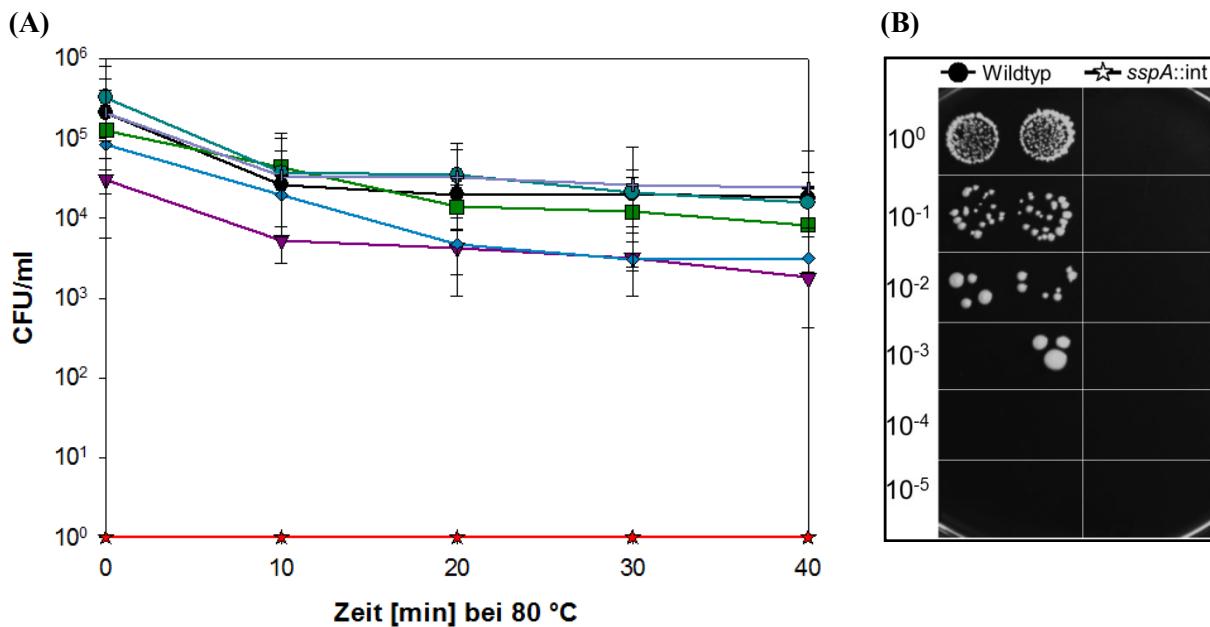


Abb. 3.15: Hitzeresistenz von Sporen der SASP-Mutanten und des Wildtyps von *C. acetobutylicum* bei 80 °C. Jeweils 4,0 x 10⁶ Sporen/ml der Stämme wurden einem Hitzestress bei 80 °C über 40 min ausgesetzt. Als Referenz (0 min) dienten unbehandelte Sporen. (A) Gezeigt sind die CFU/ml von Wildtyp (●), der sspA Mutante (★), der sspB Mutante (■), der sspD Mutante (◆), der sspF Mutante (▼), der sspH Mutante (○) und der tlp Mutante (✚). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$). (B) Exemplarischer Sporen-Assay von Wildtyp und sspA Mutante auf RCA-Festmedium nach 24 h Inkubation unter anaeroben Bedingungen (10⁰-10⁻⁵, sequentielle Verdünnungsstufen). Der dargestellte Zeitpunkt entspricht 0 min (unbehandelte Sporen).

Tab. 3.4: Resistenzen von Sporen der SASP-Mutanten und des *C. acetobutylicum* Wildtyps bei 80 °C.

Stamm	Wildtyp	sspA::int	sspB::int	sspD::int	sspF::int	sspH::int	tlp::int
D _{80 °C} in min ¹	37,4 ± 2,7	-†	33,8 ± 4,7	28,1 ± 3,0*	32,6 ± 1,2	30,3 ± 5,4	42,3 ± 1,7

¹ Daten wurden einem D-Wert angenähert; † Berechnung nicht möglich, da keine CFU/ml; * $p \leq 0,05$; n=5.

Normalerweise ergeben sich bei konstanter Temperatureinwirkung über einen gewissen Behandlungszeitraum exponentielle Abtötungskurven (Reaktion 1. Ordnung), die zur Berechnung der dezimalen Reduktionzeit (D-Wert) herangezogen werden (Krämer, 2002). Für die Stämme von *C. acetobutylicum* waren keine exponentiellen Absterbekurven ersichtlich, weshalb die Resistenzen der Sporen einem D-Wert angenähert wurden (Tab. 3.4).

Die Keimungsanalysen der Sporen auf RCA-Festmedium zeigten, dass bereits zum Zeitpunkt noch unbehandelter Sporen (0 min, Abb. 3.15, A) zwei SASP-Mutanten im Vergleich zum

Wildtyp eine signifikant verringerte Koloniebildung (CFU/ml) aufwiesen. So zeigten Sporen der *sspF* Mutante $3,07 \times 10^4$ CFU/ml ($p \leq 0,01$) und die der *sspD* Mutante $8,31 \times 10^4$ CFU/ml ($p \leq 0,05$), wohingegen der Wildtyp $2,12 \times 10^5$ CFU/ml erreichte. Ein offensichtlicher Phänotyp war bei der *sspA* (*cac2365*) Mutante gegeben, denn zu keinem Zeitpunkt, selbst bei unbehandelten Sporen (0 min, Abb. 3.15, A, B), konnte auch nur eine CFU detektiert werden ($p \leq 0,001$). Demnach war auch eine Berechnung der dezimalen Reduktionzeit nicht möglich (Tab. 3.4). Dieser Phänotyp konnte dabei durch drei unabhängig generierte *sspA* Mutantenstämme (*cac2365::int(103a)* Nr. 22, 21 und 15; Tab. 2.1) bestätigt werden.

Weiterhin konnte für die *sspF* Mutante auch nach einer 10 minütigen Behandlung bei 80 °C eine signifikant verringerte Koloniebildung mit $5,2 \times 10^3$ CFU/ml ($p \leq 0,05$) nachgewiesen werden, wohingegen der Wildtyp $2,6 \times 10^4$ CFU/ml aufwies. Im weiteren Verlauf des Stressexperiments ab 20 min zeigten, bis auf die *sspA* Mutante, keine der anderen SASP-Mutanten einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp von *C. acetobutylicum*.

In Bezug auf die angenäherten dezimalen Reduktionszeiten der Stämme, wurde für die *sspD* Mutante ein signifikant verringrigerter D-Wert im Vergleich zum Wildtyp ermittelt (Tab. 3.4). So waren Sporen der *sspD* Mutante bereits nach ca. 28 min um eine Zehnerpotenz reduziert, wohingegen die Sporen des Typstamms erst nach ca. 37 min um 90 % des Anfangswertes verringert waren. Vergleichend dazu zeigte die *tlp* Mutante bei den Analysen mit ca. 42 min die höchste dezimale Reduktionszeit, dieser Wert war jedoch nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

3.5.4 Sporenkeimung der SASP-Mutanten in Flüssigmedium

Für die Keimungsanalysen von Sporen in Flüssigmedium (2.16.5) wurden die nach 120 h gebildeten Sporen des Wildtyps und der SASP-Mutanten von *C. acetobutylicum* (3.5.2) aufgereinigt (2.16.2.1) und einheitlich auf $4,0 \times 10^6$ Sporen/ml verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden je 500 µl zwei unterschiedlichen Hitzebehandlungen bei 80 °C bzw. 65 °C für 10 min ausgesetzt und anschließend in 10 ml CGM-Komplexmedium inkuliert. Als Kontrolle dienten dabei unbehandelte Sporen, die direkt in 10-ml-CGM-Kulturen inkuliert wurden. Um die Stabilität der Insertionsmutanten zu gewährleisten, erfolgte dabei die Zugabe von Erythromycin zum CGM-Medium (2.3.1). Für die Analysen wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers das Keimungsverhalten und das Wachstum der Sporen bei 600 nm über 24 Stunden verfolgt (Abb. 3.16) und anschließend die Wachstumsparameter der einzelnen Stämme ermittelt (Tab. 3.5).

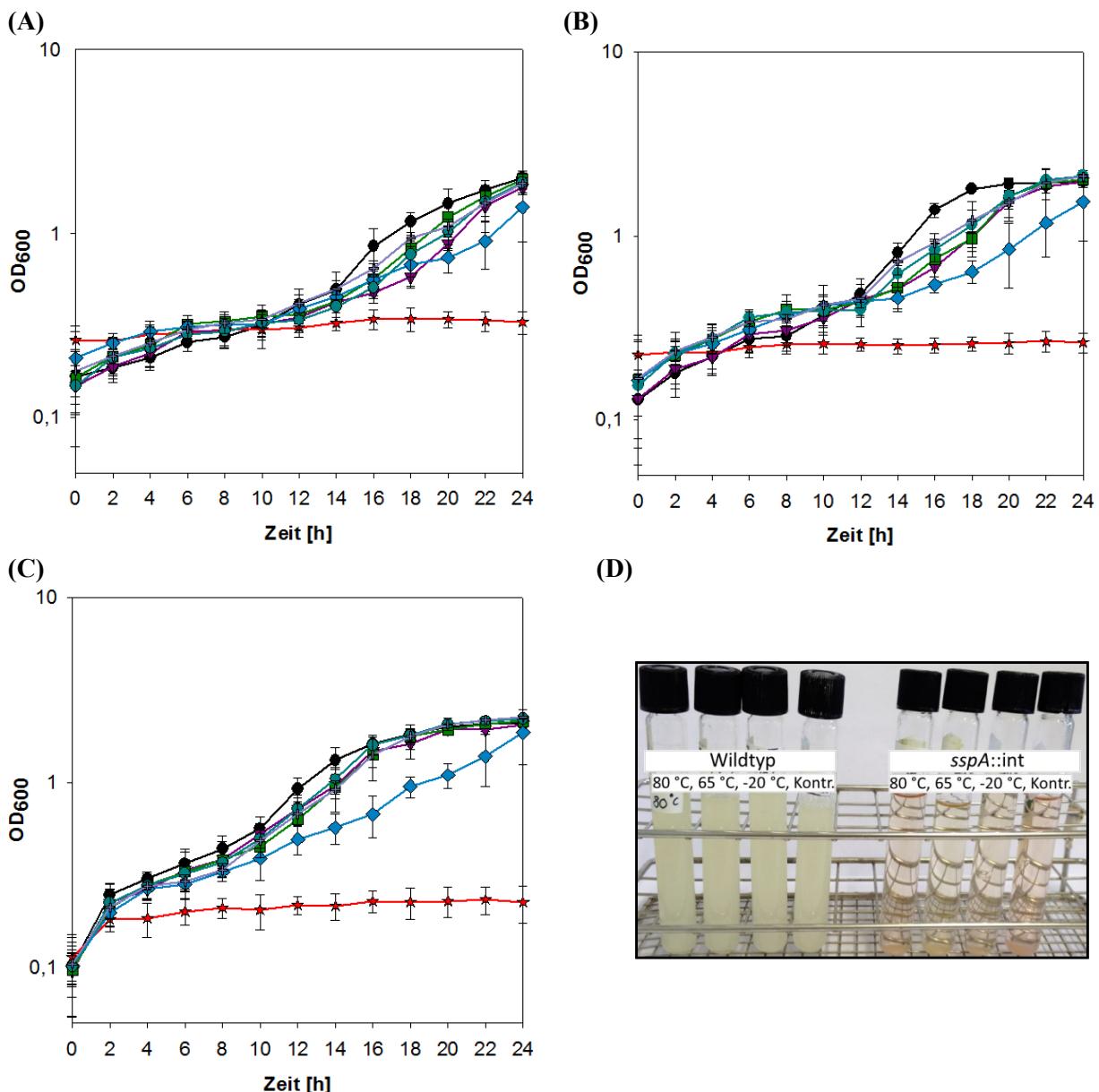


Abb. 3.16: Keimungsanalysen von Sporen der SASP-Mutanten und des Wildtyps von *C. acetobutylicum* in Komplexmedium. Je 500 µl mit $4,0 \times 10^6$ Sporen/ml der Stämme wurden vor Inokulation in 10-ml-CGM-Kulturen unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt: (A) Hitzebehandlung für 10 min bei 80 °C. (B) Hitzebehandlung für 10 min bei 65 °C und (C) Kontrolle unbehandelter Sporen. Das Wachstum der Sporen wurde für den Wildtyp (●), die *sspA* Mutante (★), die *sspB* Mutante (■), die *sspD* Mutante (◆), die *sspF* Mutante (▼), die *sspH* Mutante (●) und für die *tlp* Mutante (+) über 24 h bei 600 nm verfolgt. (n=3), (p ≤ 0,001). (D) Exemplarische 10-ml-CGM-Kulturen vom Wildtyp und der *sspA* Mutante nach 120 h Inkubation bei 37 °C. Ursprüngliche Behandlungen (t_0): 80 °C, 10 min; 65 °C, 10 min; -20 °C, 2 h; Kontrolle, unbehandelte Sporen.

Tab. 3.5: Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der SASP-Mutanten und des Wildtyps von *C. acetobutylicum* aus Sporen in 10-ml-CGM-Kulturen nach unterschiedlichen Behandlungen.

Stamm	80 °C, 10 min		65 °C, 10 min		unbehandelt	
	μ [h ⁻¹]	t _d [h]	μ [h ⁻¹]	t _d [h]	μ [h ⁻¹]	t _d [h]
Wildtyp	0,131	5,28	0,184	3,78	0,125	5,55
sspA::int†	-	-	-	-	-	-
sspB::int	0,122	5,67	0,132	5,24	0,123	5,63
sspD::int	0,104	6,64	0,120	5,75	0,102	6,79
sspF::int	0,122	5,69	0,129	5,37	0,120	5,78
sspH::int	0,126	5,52	0,161	4,29	0,124	5,60
tlp::int	0,122	5,70	0,145	4,78	0,127	5,48

Die Wachstumsparameter wurden anhand von Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen bestimmt.

† Berechnung von μ und t_d nicht möglich da kein Anstieg der OD₆₀₀. μ , Wachstumsrate; t_d, Verdopplungszeit.

Bei den Keimungsanalysen von Sporen in Flüssigmedium war ersichtlich, dass nach den Hitzebehandlungen der Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase im Vergleich zu unbehandelten Sporen signifikant verzögert war. So erfolgte der Beginn des exponentiellen Wachstums bei allen Stämmen, bis auf die *sspA* Mutante, nach einer 80 °C Behandlung erst ab ca. 10 h (Abb. 3.16, A) und nach einer 65 °C Behandlung erst ab ca. 8 - 12 h (Abb. 3.16, B). Bei den Kontrollen hingegen konnte, bis auf *sspA::int*, ein Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase bereits nach ca. 2 h nachgewiesen werden (Abb. 3.16, C).

Wie auch zuvor bei den Keimungsanalysen auf Festmedium (Abb. 3.15), war die *sspA* Mutante unter den getesteten Bedingungen, selbst bei unbehandelten Sporen nicht in der Lage in Flüssigmedium aus den Sporen anzuwachsen (Abb. 3.16, A-D). Auch nach verlängerter Inkubationszeit von 120 h zeigte die *sspA* Mutante nach den unterschiedlichen Behandlungen kein Wachstum in Komplexmedium (Abb. 3.16, D). Dieser Phänotyp konnte durch drei unabhängig generierten *sspA* Mutanten (Tab. 2.1) bestätigt werden. Um eine Schädigung der Sporen von *sspA::int* durch die vorgenommenen Aufreinigungsschritte (2.16.1; 2.16.2.1) auszuschließen, wurden Zellen der *sspA* Mutante aus CGM-Glycerinkultur (2.4) auf RCA-Platten ausgestrichen und für 21 Tage inkubiert (Abb. 7.11; Anhang). Während dieser Zeit kam es zur Ausbildung von Sporen. Nach Ablauf der 21 Tage waren restliche vegetative Zellen nicht mehr vital und somit nur Sporen auf den Platten vorhanden. Diese unter

optimalen Bedingungen gelagerten Sporen wurden für eine erneute Inokulation in CGM-Medium verwendet, aber auch nach 120 h Inkubation konnte kein Wachstum in CGM-Medium nachgewiesen werden (siehe, Abb. 7.11; Anhang).

Neben dem Defekt der *sspA* Mutante ($p \leq 0,001$), zeigte die *sspD* Mutante hinsichtlich der Wachstumsraten und Verdopplungszeiten bei allen Behandlungen die geringsten Werte (Tab. 3.5), welche zum Teil aus den Abbildungen 3.16 A - C hervorgehen. Jedoch beim Vergleich dieser Werte gegen den *C. acetobutylicum* Typstamm waren diese als nicht signifikant zu betrachten ($p \geq 0,05$). Auch bei den anderen SASP-Mutanten konnten vergleichend zum Typstamm keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Dabei zeigte der Wildtyp bei den Keimungsanalysen der Sporen nach einer 80 °C bzw. 65 °C Behandlung die höchsten Wachstumsraten von $0,131 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,184 \text{ h}^{-1}$ und daraus resultierend die kürzesten Verdopplungszeiten von 5,28 h bzw. 3,78 h (Tab. 3.5). Bei den unbehandelten Sporen war die *tlp* Mutante im Wachstum und der Verdopplungszeit etwas schneller als der Wildtyp und erreichte Werte von $\mu = 0,127 \text{ h}^{-1}$ und $t_d = 5,48 \text{ h}$ (Tab. 3.5).

3.5.5 Dipicolinsäure (DPA) in Endosporen

Dipicolinsäure spielt eine wichtige Rolle bei der Resistenz von Endosporen, indem sie unter anderem den Wassergehalt im Sporenkern herabsetzt und die Sporen-DNA schützt (Setlow, 2006). Es galt zu untersuchen, ob die SASP-Insertionsmutanten eventuell aufgrund von polaren Effekten in ihrem Gehalt an DPA verändert sind, wodurch eine verminderte Resistenz der Sporen nicht zweifelsohne dem fehlenden SASP zugeschrieben werden könnte. Für die Analysen wurden $4,0 \times 10^6$ Sporen/ml eingesetzt. Die Messungen der DPA-Chelatkomplexe erfolgten mit Hilfe eines Spektralphotometers bei 440 nm (2.16.3). Anhand einer DPA-Eichreihe konnten die DPA-Konzentrationen in den Sporen bestimmt werden (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Dipicolinsäuregehalt in SASP-Mutanten- und Wildtyp-Sporen von *C. acetobutylicum*.

Stamm	Wildtyp	<i>sspA::int</i>	<i>sspB::int</i>	<i>sspD::int</i>	<i>sspF::int</i>	<i>sspH::int</i>	<i>tlp::int</i>
DPA [µg/ml]¹	$10,6 \pm 3,3$	$10,9 \pm 3,2$	$9,4 \pm 3,9$	$10,3 \pm 3,9$	$9,6 \pm 2,8$	$10,9 \pm 3,8$	$9,3 \pm 3,5$

¹ 4×10^6 Sporen/ml wurden nach Nicholson & Setlow (1990) auf ihren DPA-Gehalt bestimmt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte aus sieben unabhängigen Experimenten.

Bei den Untersuchungen der Sporen hinsichtlich ihres Dipicolinsäuregehalts ließen sich im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Unterschiede ermitteln. Im Durchschnitt betrug

der DPA-Gehalt von $4,0 \times 10^6$ Sporen/ml ca. 10 µg/ml, wobei tendenziell die *sspH* und die *sspA* Mutante mit 10,9 µg/ml den höchsten DPA-Wert und die *tlp* Mutante mit 9,3 µg/ml den geringsten DPA-Wert aufwies.

3.6 TEM- und Phasenkontrastmikroskopische Analysen der Sporeneime

Um die Morphologie von Sporen der SASP-Mutanten mit denen des Wildtyps vergleichen zu können, wurden Transmissionselektronmikroskopische Aufnahmen (TEM) in Kooperation mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock angefertigt. Vor der Fixierung der Proben (2.7.2) wurden die Sporen (2.16.2.1) über Nacht bei 4 °C in *A. dest.* gelagert, um eine Keimung einzuleiten (Schichnes, 2006) und dadurch auch das Keimungs- und Auswachsverhalten der Sporen analysieren zu können. Ein Augenmerk lag dabei auf der *sspA* Mutante, um eventuell Aufschlüsse darüber zu erhalten, warum die Sporen nicht in der Lage waren Kolonien auszubilden oder in Medium anzuwachsen (3.5.3, 3.5.4).

Die Abbildung 3.17 zeigt TEM-Aufnahmen von Sporen der SASP-Mutanten und des Wildtyps von *C. acetobutylicum*, indem drei verschiedene Stadien der Sporen zu sehen sind: der Ruhezustand (1), die Keimung (2) und das Auswachsen einer neuen vegetativen Zelle (3).

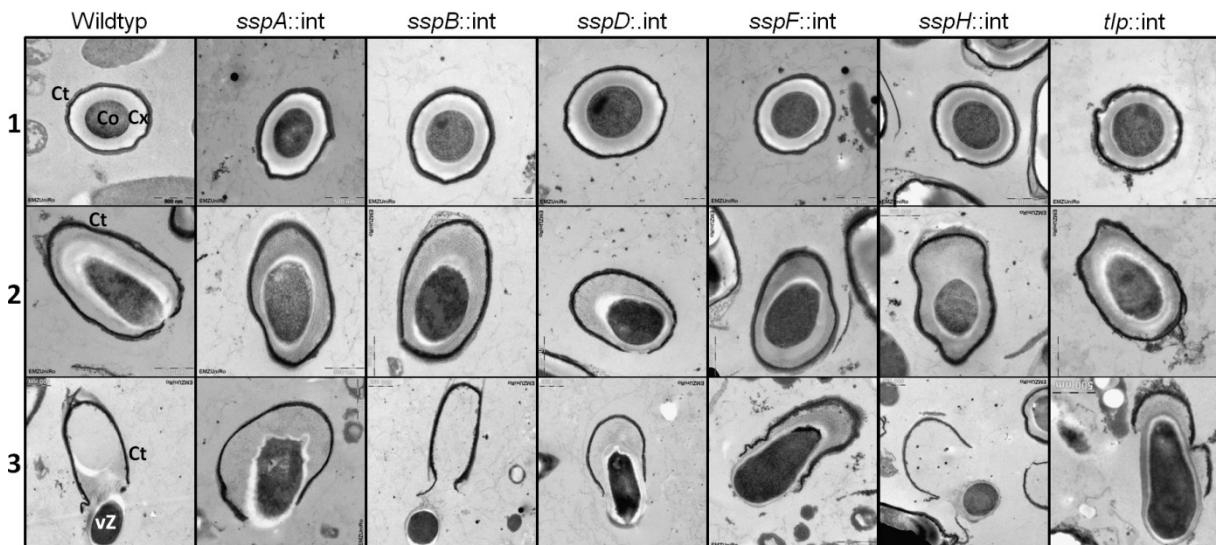


Abb. 3.17: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Sporen des Wildtyps und der SASP-Mutanten von *C. acetobutylicum*. Die TEM-Aufnahmen zeigen drei Entwicklungsstadien: (1) Ruhende Sporen, bei denen ein Sporenmantel (Coat, Ct) den dicken Cortex (Cx) umhüllt und ein kompakter innerer Sporenkern (Co) zu sehen ist. (2) Keimungsinduzierte Sporen, die aufgrund von Wasseraufnahme auf das 1,5- bis 2-fache ihrer Originalgröße angeschwollen sind. Der Cortex ist dabei weitestgehend abgebaut. (3) Das polare Auswachsen der neuen vegetativen Zelle (vZ) aus dem Sporangium (Ct). Größenbalken: 200 bzw. 500 nm.

Bei allen untersuchten Stämmen von *C. acetobutylicum* konnten die drei unterschiedlichen Stadien der Sporen (Ruhezustand, Keimung, Auswachsen) nachgewiesen werden. Dabei waren im Hinblick auf die ausgebildeten, überdauernder Sporen (Abb. 3.17, 1) keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Alle Sporen zeigten ähnliche Größen mit einem Durchmesser von 850-1150 nm und der Cortex war mit 150-220 nm in der Breite unverändert. Auch hinsichtlich des umgebenden Sporenmantels und des inneren Sporenkerns konnten keine morphologischen Unterschiede festgestellt werden. Weiterhin konnte bei allen Stämmen eine Sporenkeimung nachgewiesen werden, sichtbar durch die ca. 2-fach vergrößerten Sporen und einem bereits hydrolysierten Cortex (Abb. 3.17, 2). Zudem waren alle Stämme in der Lage eine neue vegetative Zelle auszubilden, die scheinbar das Sporangium zu verlassen schien (Abb. 3.17, 3). Für die *sspA* Mutante, die keine Kolonien ausbildete (3.5.4) und in Flüssigmedium auch nicht anwuchs (3.5.4), scheint dieser Sachverhalt zunächst paradox, weshalb der Keimungsprozess von Sporen der *sspA* Mutanten mittels Phasenkontrastmikroskopie vergleichend zum Wildtyp untersucht wurde (Abb. 3.18).

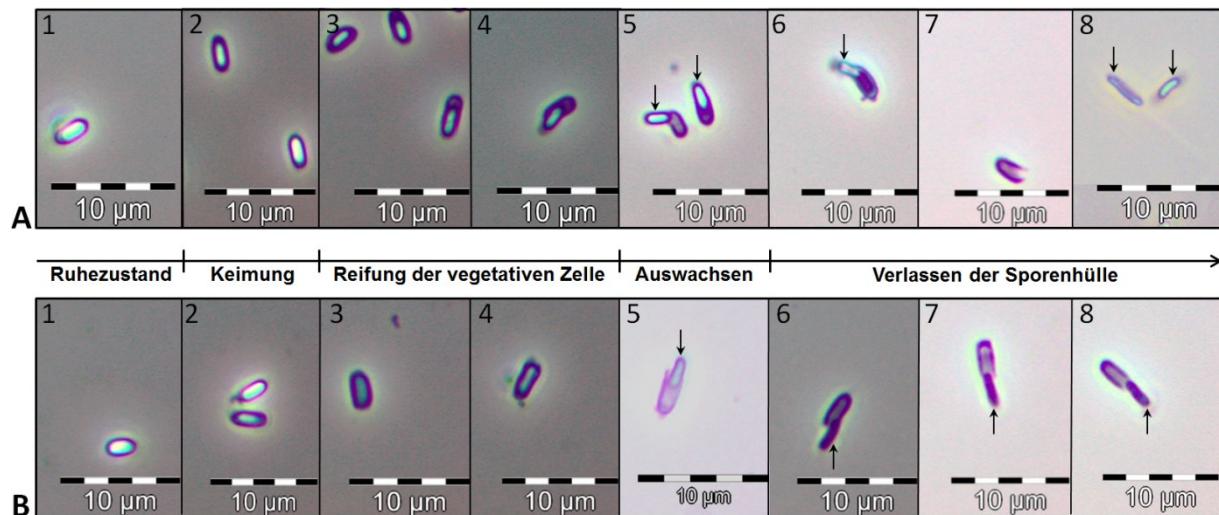


Abb. 3.18: Phasenkontrastmikroskopische Analysen zur Auskeimung von Sporen des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*. Die Aufnahmen (1-8) zeigen den Verlauf einer ruhenden Spore und deren Entwicklung bis zum Auswachsen einer neuen vegetativen Zelle. Der Zeitstrahl repräsentiert dabei die einzelnen Entwicklungsstufen und Pfeile in den Abbildungen markieren die neu geschlüpften Zellen. (A) *C. acetobutylicum* ATCC 824. (B) *C. acetobutylicum* *sspA* Mutante.

Die Abbildung 3.18 zeigt die Entwicklung einer ruhenden Endospore bis zum Auswachsen einer neuen vegetativen Zelle mittels Phasenkontrastmikroskopie. Aus anfänglich lichtbrechenden Sporen (1) wurden mit Einleitung der Keimung lichtmikroskopisch dunkel erscheinende Sporen (2), in denen sich eine neue Zelle in Richtung des äußeren Sporenmantels

entwickelte (3-4). Nach weiterer Reifung erfolgte das Auswachsen der Zelle aus dem Sporangium (5), wonach im Falle des Wildtyps sich die neue Zelle frei im Medium bewegen konnte und eine leere Sporenhülle zurückblieb (Abb. 3.18, A, 6-7). Kurz danach kam es bereits zu einer ersten Zellelongation der Wildtyp-Zellen (Abb. 3.18, A, 8).

Die letzten Entwicklungsschritte des Wildtyps (Abb. 3.18, A, 6-8), konnten bei der *sspA* Mutante nicht nachgewiesen werden. Es kam nur in 10-15 % der Fälle zur Ausbildung einer vegetativen Zelle, die das Sporangium zu verlassen schien, jedoch war diese nicht vital und verblieb ohne Anzeichen auf Motilität in der Nähe oder noch im Sporangium (Abb. 3.18, B, 6-8). Auch eine Zellelongation wie beim Wildtyp (Abb. 3.18, A, 8) konnte bei den Zellen der *sspA* Mutante nicht nachgewiesen werden. Zudem erschienen die vegetativen Zellen der *sspA* Mutante in der Phasenkontrastmikroskopie in der gleichen Schattierung (dunkel) wie die Sporenhülle (Abb. 3.18, B, 6-8), wohingegen die vitalen Zellen des Wildtyps hell zu erkennen waren (Abb. 3.18, A, 5-6, 8). Das Ergebnis zeigte, dass die vegetativen Zellen der *sspA* Mutante kurz nach dem Auswachsen (10-15 %) oder noch im Sporangium (~80 %) ihr Wachstum und ihre Vitalität einstellten.

3.7 Untersuchungen zur *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*

Aufgrund des auffälligen Phänotyps der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*, sollten im Folgenden Ursachen für den Vitalitätsverlust der sich entwickelnden vegetativen Zellen ermittelt werden. Daher wurden vergleichend zum Wildtyp von *C. acetobutylicum* der Sporenmantel untersucht (3.7.1), DNA aus den Endosporen isoliert (3.7.2), eine regulatorische Rückkopplung der SASPs von *C. acetobutylicum* untersucht (3.7.3), die *sspA* Mutante mit unterschiedlichen SASPs komplementiert (3.7.4), die SASPs aus den Endosporen isoliert (3.7.5), sowie der Gehalt an SASPs mittels Immunelektronenmikroskopie *in vivo* in den Endosporen analysiert (3.7.6).

3.7.1 Entmantelung von *C. acetobutylicum* Endosporen

Um einen Einfluss eines durch Mutation veränderten Sporenmantels auf das Keimungsverhalten von Sporen der *sspA* Mutante ausschließen zu können, erfolgten Entmantelungen der Sporen nach Burns *et al.* (2010). Dazu wurden reine Sporen (2.16.2.1) mit einer Konzentration von $6,0 \times 10^6$ Sporen/ml von dem Wildtyp und der *sspA* Mutante

zunächst entsprechend behandelt (2.16.4.3) und nach einer Pasteurisierung (80°C , 10 min) mit Hilfe eines Sporen-Assays (2.16.4.1) auf ihr Koloniebildung untersucht (Abb. 3.19). Dabei erfolgte bei der *sspA* Mutante die Zugabe von Erythromycin zum RCA-Medium (2.3.1).

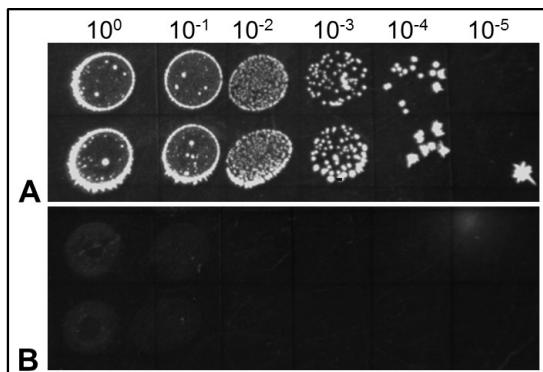


Abb. 3.19: Koloniebildung entmantelter Sporen des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*. $6,0 \times 10^6$ Sporen/ml wurden nach Burns *et al.* (2010) entmantelt und nach Pasteurisierung (80°C , 10 min) ihre CFU/ml auf RCA-Festmedium bestimmt. (A) *C. acetobutylicum* ATCC 824. (B) *C. acetobutylicum* *sspA* Mutante. 10^0 - 10^{-5} , sequentielle Verdünnungsstufen; (n=3).

Auch die entmantelten Sporen der *sspA* Mutante waren nicht in der Lage zu Kolonien auszuwachsen (Abb. 3.19, B), Wildtypsporen hingegen erreichten auch ohne Sporenmantel im Durchschnitt $3,39 \times 10^4$ CFU/ml (Abb. 3.19, A).

3.7.2 Isolierung von DNA aus *C. acetobutylicum* Endosporen

Ein weiterer Punkt der Analyse betraf die Frage, ob intakte DNA aus den Sporen des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* isoliert werden kann. Dazu erfolgte zunächst eine Anzucht beider Stämme in pH-regulierten 1,5-l-Batch-Kulturen (2.5.1.2). Das mit 1,3 l Minimalmedium für Sporulation (2.3.1) gefüllte und autoklavierte Kulturgefäß wurde jeweils mit einer logarithmisch wachsenden, 10-16 h alten MMfVK-Vorkultur (200 ml) angeimpft. Die Anwachphasen erfolgten unter einer pH-Kontrolle von 5,2, wobei ab einer OD₆₀₀ von ca. 2 der minimal zugelassene pH-Wert auf 4,7 gesetzt wurde (2.5.1.2). Durch Butyrat (40 mM) im Sporulationsmedium (Rieger, 2006), kam es zu einer verstärkten Sporulation der *C. acetobutylicum* Stämme (70-80 %). Die Sporen wurden nach etwa 136 h Inkubation geerntet (2.16.1) und mit Hilfe von Lysozym von restlichen vegetativen Zellen befreit (2.16.2.2). Anschließend erfolgte der Aufschluss der Sporen mittels FastPrep und die DNA konnte durch eine Kombination der Methoden nach Waterman *et al.* (2006) und Bertram (1989) isoliert werden (2.8.3).

Die Abbildung 3.20 (A) zeigt die Proben der isolierten Sporen-DNA des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*, welche anschließend in einer PCR eingesetzt wurden, um zu überprüfen ob das Haushaltsgen der 16S rRNA und ein willkürliches Gen, in diesem Fall das Gen der YyaC-Protease (*cac2857*) amplifiziert werden konnten (Abb. 3.20, B).

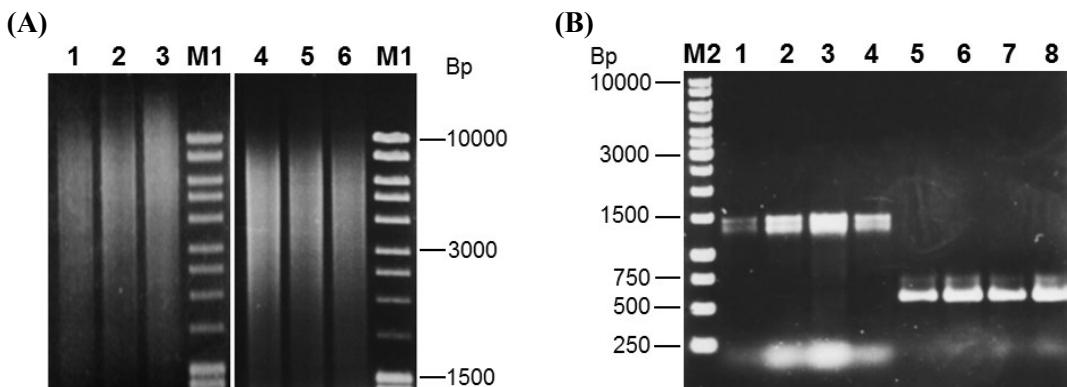


Abb. 3.20: PCR-Amplifikationen zur Überprüfung der Intaktheit von DNA aus Wildtyp- und aus *sspA::int*-Sporen von *C. acetobutylicum*. Dargestellt sind 0,8 % [w/v] Agarosegele. (A) Isolierte DNA (~1 µg pro Spur) aus Sporen des Wildtyps (Spuren 1 - 3) und der *sspA* Mutante (Spuren 4 - 6). (B) PCR-Amplifikationen unter Einsatz von je 10 ng Sporen-DNA des Wildtyps (Spuren 1, 2 und 5, 6) und der *sspA* Mutante (Spuren 3, 4 und 7, 8) für das 16S rRNA-Gen (30 Zyklen, 1500 Bp, Spuren 1 - 4) und für das *yycA*-Gen (30 Zyklen, 568 Bp, Spuren 4 - 8). M1/M2, MassRuler Mix/1 kB DNA Ladder.

Sowohl für den Wildtyp, als auch für die *sspA* Mutante konnte die DNA aus den Sporen isoliert werden (Abb. 3.20, A). Dabei gab es hinsichtlich der gewonnenen Mengen mit 1,01 - 1,32 µg/µl keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. Die Isolierung von Sporen-DNA mittels FastPrep® führte zu fragmentierter, geschorener DNA (Torok, 2003), die mittels PCR amplifiziert werden konnte. Unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotide (Tab. 7.1; Anhang) wurde sowohl das Haushaltsgens der 16S rRNA (~1500 Bp), als auch das *yycA*-Gen (~568 Bp) amplifiziert. In Bezug auf die Mengen und die Qualität der PCR-Fragmente konnten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *sspA* Mutante nachgewiesen werden (Abb. 3.20, B).

3.7.3 Regulationen der SASPs von *C. acetobutylicum* auf Transkriptebene

Untersuchungen bei *B. subtilis* zeigten eine Rückkopplung zwischen den Haupt-SASPs (SASP-α, SASP-β), indem die Inaktivierung von SASP-α zu einer 2-fachen Erhöhung des Transkriptlevels von SASP-β führte und umgekehrt (Mason & Setlow, 1986), um offensichtlich ein konstantes Level an verfügbaren Haupt-SASPs zu gewährleisten (Mason et al., 1988a). Um zu untersuchen, ob eine derartige regulatorische Rückkopplung auf

transkriptioneller Ebene auch bei *C. acetobutylicum* besteht, wurde Gesamt-RNA aus dem Typstamm und der *sspA* Mutante zum Zeitpunkt der frühen Sporulation ($t= 27$ h) isoliert (2.8.4) und nach erfolgter cDNA Synthese, diese für eine Analyse der *ssp* Transkripte in einer sqRT-PCR (2.10.2.4) eingesetzt (Abb. 3.21).

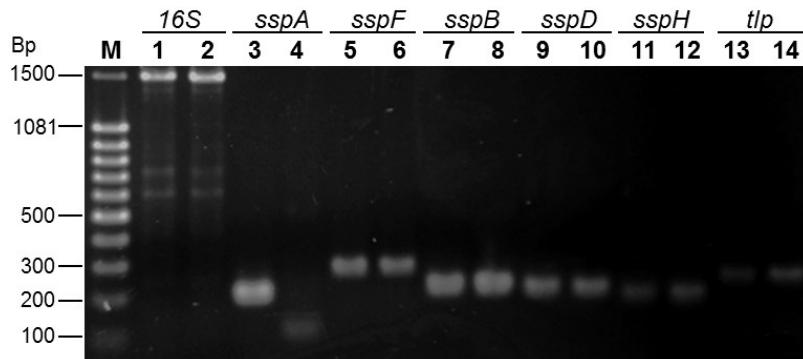


Abb. 3.21: Vergleichende sqRT-PCR von *ssp* Gentranskripten im *C. acetobutylicum* Wildtyp und in der *sspA* Mutante. Dargestellt ist ein 1 % [w/v] Agarosegel. Vom Wildtyp (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) und der *sspA* Mutante (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14) wurde je 100 ng cDNA (frühe Sporulation, $t= 27$ h) in einer sqRT-PCR (30 Zyklen) eingesetzt. PCR-Amplifikationen der *ssp* Transkripte erfolgten unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotide (Tab. 7.1) für *sspA* (198 Bp, Spur 3, 4), *sspF* (265 Bp, Spur 5, 6), *sspB* (201 Bp, Spur 7, 8), *sspD* (195 Bp, Spur 9, 10), *sspH* (177 Bp, Spur 11, 12) und *tlp* (228 Bp, Spur 13, 14). Als Kontrolle vergleichbarer cDNA-Mengen dienten 16S rRNA Gene (30 Zyklen, 1500 Bp, Spur 1, 2). M, MassRuler DNA Ladder; (n=2).

Die Analysen mittels sqRT-PCR erbrachten keinerlei Hinweise darauf, dass eines der anderen *ssp* Gene eine erhöhte mRNA-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Wie bereits in vorherigen Expressionsanalysen, zeigte dabei das *sspA*-Gen die stärkste Transkription (Abb. 3.21, Spur 3) und in der entsprechenden Mutante konnte kein *sspA* Transkript nachgewiesen werden (Abb. 3.21, Spur 4). Für die anderen SASPs konnten mengenmäßig unveränderte mRNA Transkripte nachgewiesen werden, die im Falle von *sspH* und *tlp*, wie in vorherigen Analysen (3.2.1), recht schwach waren und spezifische Genprodukte sich nur schwer im Agarosegel erkennen ließen.

3.7.4 Komplementationstests der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*

Um polare Effekte in der *sspA* Insertionsmutante auszuschließen, erfolgten bereits in der Diplomarbeit (Wetzel, 2012) Plasmid-gestützte Komplementationen, in denen unter der Kontrolle des nativen *sspA* Promotors das intakte *sspA* Gen wieder bereitgestellt wurde. Es

zeigte sich, dass die Sporen der Komplementanten in der Lage waren auf Festmedium in ähnlicher Abundanz auszukeimen wie der Wildtyp.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob auch andere SASPs den Vitalitätsverlust der *sspA* Mutante kompensieren könnten. Daher wurden SspB, SspD, SspF und SspH unter Kontrolle ihrer jeweils nativen Promotoren ($P^{sspB+sspB}$, $P^{sspD+sspD}$, $P^{sspF+sspF}$, $P^{sspH+sspH}$), als auch unter Kontrolle des *sspA* Promotors ($P^{sspA+sspB}$, $P^{sspA+sspD}$, $P^{sspA+sspF}$, $P^{sspA+sspH}$) für vergleichende Komplementationstests eingesetzt. Als Kontrolle diente der leere pT-Vektor (Schulz, 2013). Ein weiterer Versuch bestand in der Bereitstellung des *sspA*-Gens unter der Kontrolle des *sspF* Promotors ($P^{sspF+sspA}$) (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Plasmid-gestützte Komplementation der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* mit unterschiedlichen *ssp* Promotor/ *ssp* Gen-Kombinationen.

Komplementation (<i>ssp</i> Promotor/ <i>ssp</i> Gen)	Anzahl getesteter Klone	Anzahl keimender Klone	CFU/ml	Zeit bis zur Auskeimung	Maximale Inkubationszeit
pT-catP:: $P^{sspA+sspA}$	16	16	$1,02 \times 10^4$	48 h	192 h
pT-catP:: $P^{sspB+sspB}$	13	-	-	-	192 h
pT-catP:: $P^{sspD+sspD}$	15	-	-	-	192 h
pT-catP:: $P^{sspF+sspF}$	12	-	-	-	192 h
pT-catP:: $P^{sspH+sspH}$	14	-	-	-	192 h
pT-catP:: $P^{sspA+sspB}$	78	-	-	-	192 h
pT-catP:: $P^{sspA+sspD}$	77	-	-	-	192 h
pT-catP:: $P^{sspA+sspF}$	39 ¹	20	$2,63 \times 10^{2***}$	96-120 h	192 h
pT-catP:: $P^{sspA+sspH}$	80	-	-	-	192 h
pT-catP:: $P^{sspF+sspA}$	18	-	-	-	192 h
pTC (Kontrolle)	71	-	-	-	192 h

¹ analysierte Klone aus zwei unabhängigen Elektroporationen; P , Promotor; *** $p \leq 0,001$.

Für die Analysen wurden die rekombinanten Komplementation-Plasmide (Verifikation Abb. 7.6; Anhang) in *E. coli* ER2275 methyliert (2.11.1.3) und anschließend in den Insertionsstamm *sspA::int(103a)* von *C. acetobutylicum* elektroporiert (2.11.2). Erfolgreiche Transformanten wurden dabei auf RCA-Medium mit Erythromycin und Thiamphenicol

selektiert und für 168 h auf den RCA-Platten inkubiert. Die lange Inkubationszeit gewährleistete die Ausbildung von Sporen bei den Komplementationsstämmen. Nach Ablauf der 168 h wurden einzelne Klone von den RCA-Platten mit einer Impfschlinge abgenommen, in jeweils 100 µl *A. dest.* gelöst und auf ihre Sporenkonzentration untersucht (2.6.3). Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 80 °C pasteurisiert und mit Hilfe eines Sporen-Assays (2.16.4.1) auf ihre Keimungsfähigkeit (CFU/ml) untersucht (Tab. 3.7). Um weiterhin die Stabilität der Transformanten zu gewährleisten, erfolgte auch dabei die Zugabe von Erythromycin und Thiamphenicol zum RCA-Medium (2.3.1).

Die Komplementationstests zeigten, dass bis auf das *sspA*-Gen, kein anderes SASP unter Kontrolle seines nativen Promotors ($P_{sspB+sspB}$, $P_{sspD+sspD}$, $P_{sspF+sspF}$, $P_{sspH+sspH}$) in der Lage war den Vitalitätsverlust von *sspA::int* aufzuheben (Tab. 3.7). Hingegen führte das *sspA*-Gen unter Kontrolle seines nativen Promotors ($P_{sspA+sspA}$) in allen getesteten Klonen zur Ausbildung hitzeresistenter Sporen mit Keimungsraten von $1,02 \times 10^4$ CFU/ml (Tab. 3.7). Hinsichtlich der Komplementation von *sspA::int* mit den SASPs unter Kontrolle des *sspA* Promotors ($P_{sspA+sspB}$, $P_{sspA+sspD}$, $P_{sspA+sspF}$, $P_{sspA+sspH}$) war nur der Komplementationstamm mit SspF in der Lage hitzeresistente Sporen auszubilden. Die Koloniebildung war mit $2,63 \times 10^2$ CFU/ml signifikant verringert ($p \leq 0,001$) und das Auswachsen mit 96-120 h deutlich verlangsamt (Tab. 3.7). Im Gegensatz dazu war die reverse Komplementation für eine Bereitstellung von *sspA* unter Kontrolle des *sspF*-Promotors ($P_{sspF+sspA}$) nicht erfolgreich.

3.7.5 Isolierung von SASPs aus *C. acetobutylicum* Endosporen

Um Aufschlüsse über die jeweiligen Anteile der SASPs in *C. acetobutylicum* Endosporen zu erhalten, wurden die Proteine aus Wildtyp-Sporen isoliert (2.14.3). Da eine regulatorische Rückkopplung der SASPs auf Transkriptebene nicht nachzuweisen war (3.7.3), sollten Analysen dazu auch auf Proteinebene erfolgen, indem vergleichend die SASPs aus Sporen der *sspA* Mutante isoliert wurden. Um ausreichende Mengen an Sporen für die Analysen zu gewährleisten, erfolgte die Anzucht beider Stämme wie unter 2.5.1.2 beschrieben in pH-regulierten 9-l-Batch-Kulturen. Nach einer Inkubation von 144 h lag bei beiden Stämmen eine Sporulationsrate von ca. 50 % vor. Die gebildeten Sporen wurden geerntet (2.16.1) und von restlichen, vegetativen Zellen mittels Lysozymbehandlung befreit (2.16.2.2). Der Aufschluss der Sporen erfolgte mit Hilfe eines FastPrep Homogenisators (2.14.2) aus denen anschließend die kleinen säurelöslichen Sporenproteine (SASPs) mittels 3 % Essigsäure extrahiert wurden

(2.14.3). Nach einer Dialyse der Extrakte gegen 1 % Essigsäure (2.14.4) konnten diese auf eine (DEAE)-Cellulose-Säule (2.14.7.1) appliziert werden, bei dem es sich um eine schwache Base handelt die Anionen bindet. Da SASPs in Essigsäure (1 %, pH < 3) eine positive Ladung aufweisen, laufen sie ohne Wechselwirkungen durch das Säulenmaterial und können von negativ-geladenen Sporenproteinen abgetrennt werden (Abb. 3.22, DEAE). Der DEAE-Säulendurchfluss wurde gesammelt und anschließend auf eine (CM)-Cellulose-Säule aufgetragen (2.14.7.2), bei dem es sich um einen Kationenaustauscher handelt und an dem folglich die SASPs binden. Eine Elution der Proteine erfolgte anschließend über zwei aufeinanderfolgende lineare Salzgradienten (Abb. 3.22, CM; 0-0,4 M und 0,4-1 M NaCl). Deren Eluate wurden gesammelt und in SDS-Gradientengelen analysiert (Abb. 3.23).

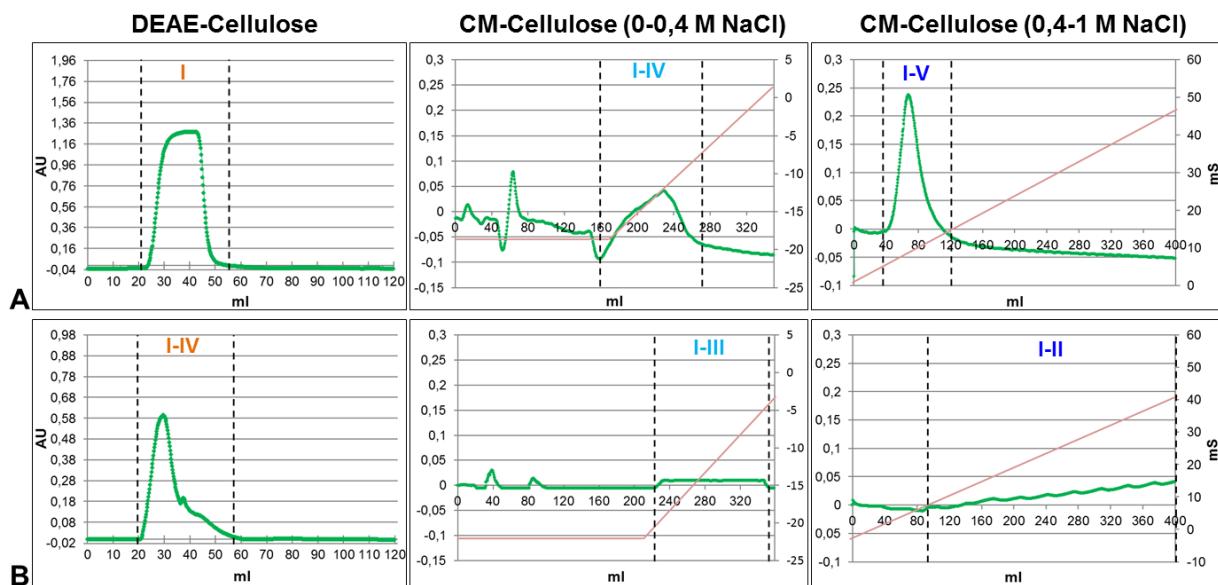


Abb. 3.22: Ionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von Sporenproteinen des Wildtyps und der *sspA* Mutanten von *C. acetobutylicum* über DEAE- und CM-Cellulose-Säulen. Dargestellt ist der Verlauf der UV-Absorption bei 280 nm (AU, grün) über ein Säulenvolumen (ml) und die Konzentration an Elutionspuffer (ms, rot). Gesammelte Fraktionen (römische Zahlen innerhalb gestrichelter Linien) wurden in SDS-Gradientengelen analysiert (siehe Abb. 3.23). (A) *C. acetobutylicum* ATCC 824. (B) *C. acetobutylicum* *sspA* Mutante.

Aus Wildtyp-Sporen einer 9-l-Batch-Kultur konnte 15 mg an Gesamtprotein isoliert werden, welches auf eine DEAE-Cellulosesäule appliziert wurde (Abb. 3.22, A). Bei der *sspA* Mutante waren die Proteinausbeuten mit 0,96 mg an Gesamtprotein deutlich geringer (Abb. 3.22, B). Der DEAE-Säulendurchfluss vom Wildtyp (Abb. 3.22, A; 5,3 mg, 25-53 ml, Fraktion I) und der *sspA* Mutante (Abb. 3.22, B; 0,2 mg, 22-58 ml, Fraktionen I-IV), wurde lyophilisiert (Labovac PK8S), in Tris-Maleinsäure (10 mM, pH 6,1) gelöst und auf eine CM-Säule aufgetragen. Dort erfolgte zunächst durch eine Äquilibrierung der Säule über 120 ml Tris-

Maleinsäure (10 mM, pH 6,1), die Bindung der SASPs an den Kationenaustauscher. Diese konnten anschließend über einen Gradienten von 0-0,4 M NaCl über 240 ml und einem zweiten Gradienten von 0,4-1 M NaCl über 400 ml eluiert werden.

In Bezug auf den Wildtyp konnte sowohl bei der ersten (0-0,4 M NaCl), als auch bei der zweiten Elution (0,4-1 M NaCl) ein starker Proteinpeak ermittelt werden (Abb. 3.22, A, 158-270 ml, Fraktionen I-IV und 38-121 ml, Fraktionen I-V). Bei der *sspA* Mutante hingegen konnte bei der ersten (0-0,4 M NaCl) und zweiten Elution (0,4-1 M NaCl) nur eine sehr schwache UV-Absorption bei 280 nm detektiert werden (Abb. 3.22, B; 221-352 ml, Fraktionen I-III und 94-400 ml, Fraktionen I-II).

Die im Zuge der Aufreinigung gewonnenen Fraktionen des Wildtyps und der *sspA* Mutante (römische Zahlen, Abb. 3.22) wurden in SDS-Gradientengelen (2.14.8.1) analysiert (Abb. 3.23, 1). Der Nachweis auf eine erfolgreiche Isolierung von SASPs erfolgte in einem Western Blot unter Einsatz eines polyklonalen Anti-SspA-Antikörpers von *C. acetobutylicum* (2.15) (Abb. 3.22, 2). Für eine genaue Bestimmungen der isolierten Proteinproben wurden die jeweiligen Proteinbanden des Wildtyps und der *sspA* Mutante (Abb. 3.23) mittels MALDI-TOF MS analysiert (Abb. 7.1 und Tab. 7.4; Anhang).

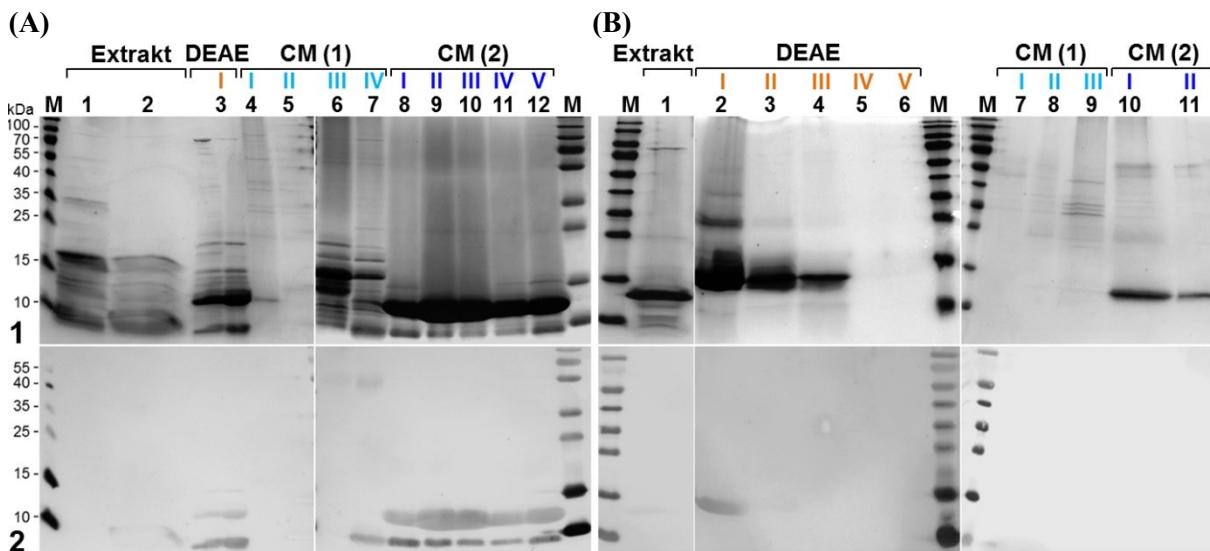


Abb. 3.23: Isolierte Sporenproteine des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*. (1) Gezeigt sind SDS-Gradientengele mit jeweils 3 µg Protein pro Spur bzw. 25 µl Probe in den Spuren 4, 5 in (A) und in Spuren 5-9 in (B). (2) Western Blot zum Nachweis von SASPs mit Hilfe eines polyklonalen Anti-SspA-Antikörpers. (A) Aufreinigung von Sporenproteinen des *C. acetobutylicum* Wildtyps über DEAE-und CM-Cellulose: isoliertes Gesamtprotein (Spuren 1-2); DEAE-Säulendurchfluss (I, Spur 3); Elutionsfraktionen der CM-Säule mit 0-0,4 M NaCl (I-IV, Spuren 4-7) und mit 0,4-1 M NaCl (I-V, Spuren 8-12). (B) Aufreinigung von Sporenproteinen der *C. acetobutylicum* *sspA* Mutante über DEAE-und CM-Cellulose: isoliertes Gesamtprotein (Spur 1); DEAE-Säulendurchfluss (I-V, Spuren 2-6); Elutionsfraktionen der CM-Säule mit 0-0,4 M NaCl (I-III, Spuren 7-9) und mit 0,4-1 M NaCl (I-II, Spuren 10-11). M, Prestained Protein Ladder.

Eine Aufreinigung und Abtrennung der Sporenproteine über DEAE- und CM-Cellulose war erfolgreich. So konnte beim Wildtyp eine graduelle Abnahme von Proteinbanden verzeichnet werden (Abb. 3.23, A1). Zu Beginn der Aufreinigung waren im SDS-Gel mehrere Proteinbanden zwischen ≤ 10 kDa bis 35 kDa sichtbar (Abb. 3.23, A1, Spuren 1-2). Nach Anwendung der DEAE-Säule kam es zu einer Aufkonzentrierung der ≤ 10 kDa und ≤ 15 kDa Proteinbanden (Abb. 3.23, A1, Spur 3) und durch Einsatz der CM-Säule zu einer weiteren Abtrennung von Proteinen zwischen 10 kDa bis 15 kDa (Abb. 3.23, A1, Spuren 6-7). Nach der zweiten Proteinelution von der CM-Säule über einen Salzgradienten von 0,4-1 M NaCl, waren letztendlich nur noch zwei Proteinbanden von ≤ 10 kDa und $\sim 12,5$ kDa im SDS-Gel nachzuweisen (Abb. 3.23, A1, Spuren 8-12), die im Western Blot zweifelsohne als SASPs bestätigt werden konnten (Abb. 3.23, A2).

Bei der *sspA* Mutante war eine Abtrennung und Aufreinigung von Proteinen ebenfalls erfolgreich, indem vergleichend zum Gesamtprotein (Abb. 3.23, B1, Spur 1) nach Einsatz der DEAE-Säule eine Aufkonzentrierung der ≤ 15 und 35 kDa Proteinbanden im SDS-Gel zu verzeichnen war (Abb. 3.23, B1, Spuren 2-4). Jedoch infolge der weiteren Aufreinigung über die CM-Cellulosesäule, konnten nach der zweiten Elution (0,4-1 M NaCl) Proteinbanden von ca. 12,5 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.22, B1, Spur 10-11), die sich im Western Blot mit dem Anti-SspA-Antikörper nicht nachweisen ließen (Abb. 3.23, B2, Spuren 10-11). MALDI-TOF Analysen bestätigten (Tab. 7.4; Anhang), dass es sich bei den Proteinbanden (Abb. 3.23, B1, Spuren 10-11) um das hypothetische Protein Cac3357 handelt, welches keine Übereinstimmungen zu SASPs aufweist („Blast“-Analysen). Beim Wildtyp hingegen konnten in den Antikörper-detektierten Proteinbanden (Abb. 3.23, A2, Spuren 7-12) fast ausschließlich nur SspA (Cac2365) nachgewiesen werden. Weitere SASPs konnten neben dem dominierenden SspA (100 % in der Probe) nur zu geringen Anteilen in den jeweiligen Proteinbanden nachgewiesen werden, als Cac1663 (SspH) mit 6,25 % in Spur 7 (≤ 10 kDa) und Cac1522 (SspB) mit 0,84 % und 1,23 % in Spur 9 und 12 (≤ 10 kDa), (Abb. 7.1, Anhang).

In den Proteinfraktionen der *sspA* Mutante konnte wie erwartet kein SspA nachgewiesen werden, aber interessanterweise konnte auch keines der anderen SASPs von *C. acetobutylicum* in den gesamten Proteinfraktionen der Mutante detektiert werden (Abb. 7.1 und Tab. 7.4; Anhang), was weitestgehend dafür spricht, dass eine Rückkopplung der SASPs in *C. acetobutylicum* auch auf Proteinebene nicht erfolgte.

3.7.6 Nachweis von SASPs mittels Immunelektronenmikroskopie

Um den Nachweis erbringen zu können, dass die SASPs von *C. acetobutylicum* ausschließlich im Kern von Sporen lokalisiert sind, erfolgten immunelektronenmikroskopische Versuche mit einem polyklonalen Anti-SspA-Antikörper von *C. acetobutylicum* (2.15) in Kooperation mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock. Zudem sollten dabei Vergleiche von SASP-Antigenen in den Sporen des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* vorgenommen werden, da *in vitro* ein gravierender SASP-Mangel in der *sspA* Mutante nachgewiesen werden konnte (3.7.5). Nun galt es diesen SASP-Gehalt auch unter *in vivo* Bedingungen zu untersuchen.

Für die Analysen wurden der Wildtyp und die *sspA* Mutante in 200-ml-MS-MES-Kulturen angezogen (2.5.1.1). Nach einer Inkubation von 72 h kam es zur Ausbildung erster freier Sporen, infolgedessen 1-ml-Proben den Zellsuspensionen entnommen und in 4 % Paraformaldehyd und 0,25 % Glutaraldehyd fixiert wurden (2.7.3). Eine weitere Einbettung und Kontrastierung der Proben erfolgte am EMZ der Universität Rostock. Für den Antigen-nachweis wurde der Anti-SspA-Antikörper (Nr. 3; 2.15) 1:500 verdünnt eingesetzt. Der polyklonale Anti-SspA-Antikörper von *C. acetobutylicum* (2.15) ist gegen das gesamte SspA-Protein gerichtet und deckt die hochkonservierten N- und C-terminalen SASP-Motive ab (siehe Abb. 3.1). Demnach ist es möglich mit diesem Antikörper weitere SASPs zu detektieren, welche für ein α/β -Typ SASP-Motiv konserviert sind bzw. dem SspA-Protein generell ähnlich sind. Im Hinblick auf die SASPs von *C. acetobutylicum* sind SspB, SspD und SspF stark, SspH mäßig und Tlp kaum für das α/β -Typ SASP-Motiv konserviert (3.1).

Die Tabelle 3.8 zeigt die durchschnittlich nachgewiesenen SASP-Antigene in den Wildtyp- und den *sspA::int*-Sporen und die Abbildung 3.24 die immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Sporen des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*.

Tab. 3.8: SASP-Antigene in Sporen des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* unter Verwendung des polyklonalen Anti-SspA-Antikörpers.

Stamm	Durchschnitt Antigennachweise pro Spore	Anzahl unabhängig ausgezählter Sporenpräparate
Wildtyp	231 ± 118 (100 %) ¹	n=22
<i>sspA</i> Mutante	17 ± 19 (7,36 %) ***	n=18

Die Auswertung erfolgte anhand einer Auszählung der Goldpartikelmarkierungen in den Sporen der Stämme.

¹ Antigenwert wurde auf 100 % gesetzt; *** p ≤ 0,0001.

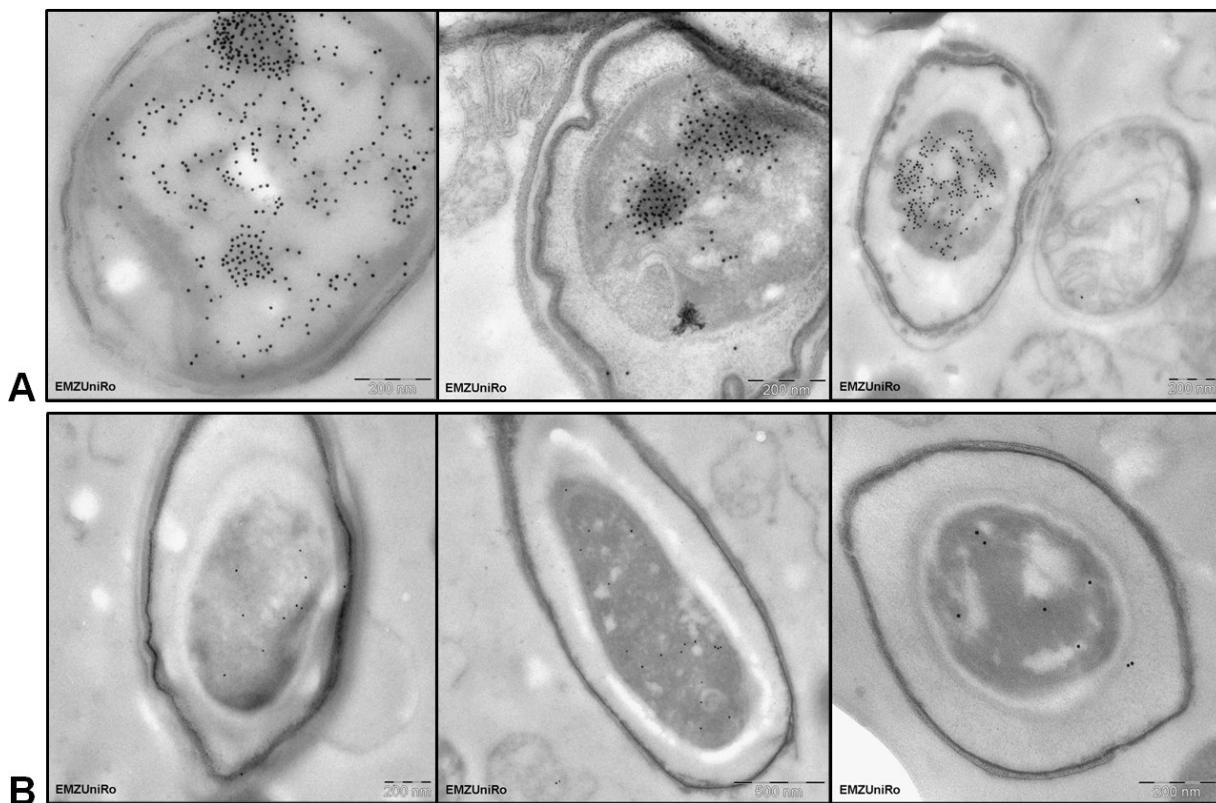


Abb. 3.24: Antigennachweise von SASPs in *C. acetobutylicum* Sporen des Wildtyps und *sspA* Mutante mittels postembedding-immunogold-Markierung. Für die Detektion der Antigene wurde der polyklonale Anti-SspA-Antikörper (1:500 verdünnt) eingesetzt. (A) *C. acetobutylicum* Wildtyp (B) *C. acetobutylicum* *sspA* Mutante. Größenbalken: 200 nm bzw. 500 nm.

Die *in vivo* Untersuchungen der *C. acetobutylicum* Sporen mittels Immunelektronenmikroskopie bestätigten zwei wichtige Ergebnisse. Zum einen, dass die SASPs nur im Kern der Sporen lokalisiert sind und zum anderen, dass auch unter *in vivo* Bedingungen ein drastischer SASP-Mangel in der *sspA* Mutante vorliegt. So konnten in den Sporen der *sspA* Mutante im Durchschnitt nur 17 SASP-Antigene (7,36 %) nachgewiesen werden, wohingegen in Wildtyp-Sporen durchschnittlich 231 SASP-Antigene detektierbar waren (Tab. 3.8). Aufgrund der Differenz in den Wildtyp- und in den *sspA*::int-Sporen beträgt demnach der Anteil an SspA in *C. acetobutylicum* Endosporen ca. 93 %. Dieser drastische Unterschied war auch in den immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Wildtyps und *sspA* Mutante deutlich erkennbar (Abb. 3.24). Dabei waren in den Wildtypsporen die zahlreichen Antigennachweise fast immer mit dem Sporennukleoid assoziiert, welches kompakt im Sporenkern vorlag und hell zu erkennen war (Abb. 3.24, A). Im Sporenkern der *sspA* Mutante hingegen waren die wenigen Antigennachweise diffus verteilt und kompakt angeordnete Nukleoidstrukturen kaum zu erkennen (Abb. 3.24, B).

4 Diskussion

Bei den Clostridien, wie *Clostridium acetobutylicum*, handelt es sich um sehr alte Bakterien, die als separate Klasse vor ca. 2,7 Milliarden Jahren noch vor dem Anstieg von freiem Sauerstoff auftraten. Die Bacilli hingegen, wie *Bacillus subtilis*, entwickelten sich als separate Klasse erst vor ca. 2,3 Milliarden Jahren, in etwa zum Zeitpunkt der „großen Sauerstoffkatastrophe“ (Paredes *et al.*, 2005; Battistuzzi *et al.*, 2004). Die unterschiedlichen Umweltbedingungen zum Zeitpunkt der Auseinanderentwicklung könnten möglicherweise die abweichenden Sporulationsprogramme der Bacilli und Clostridien erklären (Paredes *et al.*, 2005). Bereits die Initiation der Sporulation unterscheidet sich wesentlich zwischen den beiden Gattungen. Während *B. subtilis* und *B. megaterium* aufgrund von Nährstoffmangel die Sporulation einleiten, führt bei *C. acetobutylicum* eine Akkumulation der Säuren Acetat und Butyrat und ein erniedriger pH-Wert zur Initiation der Sporulation trotz Nährstoffüberschuss (Al-Hinai *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu den Bacilli, weisen Clostridien dabei kein Phosphorelay-System zur Aktivierung des Masterregulators auf, sondern phosphorylieren Spo0A direkt über Histidin-Kinasen (Dürre, 2011). Auch die Sporulationskaskade (Errington, 1993, 2003) scheint unterschiedlich reguliert zu sein. Im Vergleich zu *B. subtilis* erfüllt der Sigma-Faktor σ^K in *C. acetobutylicum* eine duale Rolle, sowohl während der frühen Sporulation, noch vor der asymmetrischen Teilung der Zelle, als auch bei der späteren Sporenreifung (Al-Hinai *et al.*, 2015). Weitere wichtige Unterschiede bestehen im Expressionslevel initialer Regulatoren wie σ^H und Spo0A, das Fehlen eines „skin“ (sigK-intervening) Elements im ORF von sigK bei *C. acetobutylicum*, eine zeitlich unterschiedliche Regulation der Sigma-Faktoren, als auch in den Synthesewegen der Dipicolinsäure (Al-Hinai *et al.*, 2015; Orsburn *et al.*, 2010).

Aufgrund bestehender Variationen in den Sporulationsprogrammen, galt es zu untersuchen, welche Verteilung und Funktion Kernsporenkomponenten, wie die „*small acid-soluble spore proteins*“ in *C. acetobutylicum* haben, welcher Regulation sie dabei unterliegen und welche Proteasen für deren Abbau verantwortlich sind.

In den folgenden Abschnitten werden die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse mit dem bekannten Wissen von Vertretern der Bacilli verglichen, um die unterschiedlichen Entwicklungen hinsichtlich der Sporulation zu verdeutlichen.

4.1 *Small acid-soluble spore proteins von C. acetobutylicum*

Vergleichende Genomanlysen von Galperin *et al.* (2012) ergaben, dass bei Clostridien im Vergleich zu den Bacilli eine unterschiedliche Anzahl an SASP-kodierenden Genen vorliegt. Wohingegen Vertreter der Gattung *Bacillus* zwischen 11 und 22 *ssp* Gene aufweisen, besitzen einige clostridielle Genome nur zwei *ssp* Gene (Galperin *et al.*, 2012). Die unterschiedlichen Anzahlen sind ein Resultat von Genduplikationen, aber auch von Genverlusten (Vocero-Villeta *et al.*, 1991; Galperin *et al.*, 2012). In der Gattung *Bacillus* kann es sich bei einigen der *ssp* Gene sogar um „Pseudogene“ handeln, die keine Ribosomenbindestelle aufweisen (Setlow, 2007). Eine Übertragung der *ssp* Gene ist zudem auch durch Phagen möglich (Élő *et al.*, 2003; Vocero-Vielleta *et al.*, 1991). So konnte ein *sspC*-Gen in dem SP β c2 *Bacillus* Phagen (Lazarevic *et al.*, 1999) und umgekehrt eine SP β -Phagenregion mit einem *sspC*-Gen in *B. subtilis* nachgewiesen werden (Ghim *et al.*, 1998).

In dem Genom von *B. subtilis*, der lange Zeit als Modellorganismus intensiv erforscht wurde, konnten bislang 16 unterschiedliche SASPs (SspA-SspP, Tlp, CsgA) identifiziert werden (Driks, 2002). Nach Nölling *et al.* (2001) sind im Genom von *C. acetobutylicum* fünf putative SASPs annotiert. Diese konnten durch entsprechende Ähnlichkeits-Analysen (Cummings *et al.*, 2002) gegen das Genom von *B. subtilis* unterschiedlichen α/β -Typ SASPs (SspA, SspB, SspD, SspF und Tlp; Tab. 3.1) zugeordnet werden. Die *in silico* Analysen identifizierten dabei und bisher unbekanntes SASP im Genom von *C. acetobutylicum*, welches Ähnlichkeiten zu einem SspH-Protein aufweist (3.1).

Interessanterweise zeigen die sechs SASP-Proteine von *C. acetobutylicum* im Vergleich zu anderen Sporenbildnern nur wenige Übereinstimmungen zueinander (maximal 45 % Tab. 7.3; Anhang) (Wetzel & Fischer, 2015). Demgegenüber besitzen *C. perfringens* und *C. botulinum* drei fast identische SASP-Proteine (Ssp1-Ssp3, >90 % Übereinstimmung; Raju *et al.*, 2007) (CBO1789, CBO1790, CBO3048, >80-89 % Übereinstimmung; Meaney *et al.*, 2015) und nur ein weiteres viertes SASP, welches sich in der Aminosäurezusammensetzung von den anderen SASPs unterscheidet. Auch bei *B. subtilis*, *B. megaterium* und bei *C. bifermentans* sind jeweils zwei nahezu identische α/β -SASPs vertreten (>90 % Übereinstimmung) (Johnson & Tipper, 1981; Setlow, 1975b; Cabrera-Martinez *et al.*, 1989; Cucchi & Sanchez de Rivas, 1998).

Aufgrund der recht unterschiedlichen SASPs und dem Tlp von *C. acetobutylicum* scheint die SASP-Komplexität eher *Bacillus*-Vertretern, als *C. perfringens* oder *C. botulinum* zu ähneln.

4.2 DNA-Bindung der SASPs von *C. acetobutylicum*

Im Hinblick auf die Evolution säurelöslicher Sporenproteine (SASPs), waren die frühen DNA-Bindepoteine für ein HTH-Bindemotiv der heutigen α/β -Typ SASPs (Abb. 3.1) nur wenig konserviert (Ge *et al.*, 2011). Durch den hohen Selektionsdruck die Sporen-DNA effektiv vor Umwelteinflüssen schützen zu müssen, wurden die Aminosäurereste für eine DNA-Schutzfunktion effizienter und sind heute hochkonserviert (Vocero-Villeta *et al.*, 1991).

Entsprechend der Konservierung des α/β -Typ DNA-Bindemotivs (Setlow, 2007; Vyas *et al.*, 2011) stellen SspA, SspB, SspD und SspF von *C. acetobutylicum* mit 100 % Konservierung starke DNA-Bindepoteine und das SspH mit 51 % Konservierung ein schwaches DNA-Bindepotein dar. Für das Tlp-Protein mit nur 32 % Konservierung konnte fast erwartungsgemäß keine DNA-Bindung nachgewiesen werden. Demnach hat der Konservierungsgrad für das N- und C-terminale HTH-Bindemotiv einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionsweise der Proteine (Hayes *et al.*, 2001; Kosman & Setlow, 2003). In Bezug auf die Schutzfunktion prokaryotischer bzw. eukaryotischer DNA ließen sich im Rahmen dieser Arbeit keine Unterschiede ermitteln. Ebenso war angereichertes natives Gesamtsporenprotein, in dem ein SspA-Anteil von 11,15 % ermittelt werden konnte, zum Schutz von Plasmid-DNA befähigt (Abb. 7.7; Anhang). Allerdings konnte keine Schutzfunktion für Gesamt-RNA demonstriert werden. Diese Erkenntnis wurde bereits 1992 von Setlow *et al.* gewonnen, wonach ein SspC von *B. subtilis* nicht in der Lage war einzel- oder doppelsträngige RNA vor enzymatischem Abbau zu schützen. Somit stellen die recht unterschiedlichen SASPs von *C. acetobutylicum*, bis auf Tlp, unspezifische DNA-Bindepoteine dar, die je nach Konservierung ihres Bindemotivs unterschiedliche Affinitäten zur DNA aufweisen. Dahingehend zeigten Sequenzanalysen der SASPs von *C. acetobutylicum* im Vergleich zu *B. subtilis* einen zusätzlichen nicht-konservierten vier bis sechs Aminosäure umfassenden Bereich zwischen dem N- und C-terminalen HTH-Bindemotiv (Abb. 3.1), welcher charakteristisch für anaerobe Sporenbildner erscheint (Setlow, 2007).

4.3 Das Protein Tlp (Cac1487)

Als einziges der rekombinant gewonnen SASPs von *C. acetobutylicum* zeigte Tlp eine Oligomerisierung, welche sowohl bei dem heterolog aus *E. coli*, als auch homolog aus *C. acetobutylicum* aufgereinigten Protein bestätigt werden konnte (Abb. 7.8, Anhang). Die

Oligomere blieben unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen stabil. Auch FPLC-Analysen unter Verwendung von β -Mercaptoethanol und DTT konnten die Oligomere nicht auflösen (Lehmann, 2013).

Die hochmolekularen Proteinbanden lassen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Interaktionen vermuten, die sich in konzentrierten Proteinproben ausbilden können und selbst unter denaturierenden oder chromatographischen Bedingungen stabil bleiben (Bricker & Frankel, 1998). Das Tlp-Protein entspricht diesem Kriterium, da es zu einem hohen Anteil aus hydrophoben Aminosäuren (~24 %) (Jenzen, 2015) besteht, die diese Interaktionen ermöglichen könnten. Hydrophobe Interaktionen formen sich dabei endothermisch und können durch ein Absenken der Umgebungstemperatur geschwächt werden (Brandts, 1967; Struvayx & Feller, 2012; Feller, 2013), wodurch es zu einer Destabilisierung der Proteinaggregate kommt (Vajpai *et al.*, 2013). In der Tat führte eine Lagerung des Proteins für sechs Monate bei -20 °C weitestgehend zu einer Auflösung der höhermolekularen Proteinbanden, so dass nur noch zwei (Abb. 3.4, A) der insgesamt fünf (Abb. 7.8, A; Anhang) Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen nachzuweisen waren.

Aufgrund relativ geringer Aminosäureübereinstimmungen zu SASPs (3.1) und einer nicht nachzuweisenden DNA-Schutzfunktion (4.2) stellte sich die Frage, welche Funktion das Tlp-Protein (Cac1487) haben könnte. Eine Funktion als putatives Thioredoxin (Tlp, Thioredoxin-like protein) konnte von Jenzen (2015) nicht bestätigt werden. Zum einen, da das Protein nur ein konserviertes Cystein in einem möglichen Trx-Motiv C-G-P-C (Holmgren, 1995) aufweist und dementsprechend keine Aktivität zeigte (Jenzen, 2015). Zum anderen, da ein Aminosäureaustausch, der einen zweiten Cysteinrest in dem putativen Trx-Zentrum (C-X-X-C) generierte, ebenfalls zu keinem funktionsfähigen Protein führte (Jenzen 2015, unveröffentlicht). Prinzipiell ist auffällig, dass Ähnlichkeitsvergleiche keine Thioredoxine aufzeigen. Es konnten lediglich Übereinstimmungen zu Tlp-Proteinen aus anderen Sporenbildnern ermittelt werden (Jenzen, 2015). Daher stellte sich die generelle Frage, die jedoch bisher nicht aufklärbar war, warum diese Proteine ursprünglich überhaupt als „SASP Tlp“ annotiert wurden (Tab. 3.1). Bisher kann nur die Aussage getroffen werden, dass es sich bei Cac1487 um ein sporenspezifisches Protein handelt (4.4). Im Gegensatz zu *B. subtilis* (Bagyan *et al.*, 1998), konnte Tlp in Sporenextrakten des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* nicht nachgewiesen werden (Tab. 7.4; Anhang), weshalb im Rahmen dieser Arbeit ungeklärt bleibt, wo das Protein lokalisiert ist.

4.4 Zeitliche Expression der SASPs von *C. acetobutylicum*

Eine sporenspezifische Funktion aller SASPs von *C. acetobutylicum* konnte dahingehend bestätigt werden, dass spezifische mRNA Transkripte nur in sporulierenden Zellen und nicht in asporogenen Zellen einer Mutante, der Spo0A als Masterregulator fehlte (Heap *et al.*, 2007) nachgewiesen werden konnten. Das *sspA*-Gen zeigte dabei tendenziell die stärkste Transkription. Weiterhin leitete sich eine sporenspezifische Regulation über die Promotorregionen der *ssp* Gene ab, die typischerweise von Vorsporen-spezifischen Sigma-Faktoren erkannt werden.

Eine Bestätigung der Ergebnisse lieferten Expressionsanalysen von Jones *et al.* (2008), wonach die Induktion der *ssp* Gene von *C. acetobutylicum* erst nach der Transitionsphase und somit nach Einleitung der Sporulation erfolgt. Darüber hinaus konnte eine σ^G -abhängige Expression für die Gene *cac2365* (*sspA*) (siehe Abb. 4.1), *cac2372* (*sspF*) und *cac1663* (*sspH*) demonstriert und eine σ^F -Bindemotif für *cac1487* (*tlp*) gestützt werden (Jones *et al.*, 2008; Jones, 2011). Die *ssp* Gene von *C. acetobutylicum* weisen somit gleiche Vorsporen-spezifische Sigma-Faktoren auf, wie die Promotorregionen der SASPs von *B. subtilis* (Abb. 7.3; Anhang) (Driks, 2002).

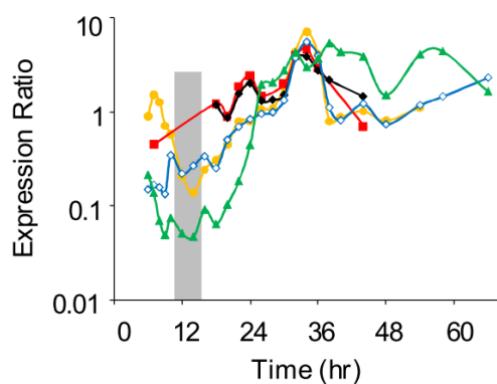


Abb. 4.1: Expressionsprofil von Genen unter Kontrolle von σ^G in *C. acetobutylicum*. (Jones *et al.*, 2008; mod.). Der graue Balken repräsentiert den Beginn der Transitionsphase. Putative Gene unter Kontrolle von σ^G : *sspA* (*cac2365*, ▲); *spoVAD* (*cac2304*, ♦); *spoVAC* (*cac2305*, ■); *sleB* (*cac0686*, ○) und *spoVT* (*cac3214*, ◇).

4.5 Funktion der SASPs in *C. acetobutylicum* Endosporen

Funktionsanalysen der SASPs von *C. perfringens*, *C. botulinum* und *B. subtilis* bestätigten ihre Bedeutung für die Resistenz gegen UV-Strahlung, Hitze und salpetriger Säure, aber auch für den Schutz der Sporen-DNA vor Chemikalien (Raju *et al.*, 2006, 2007; Meaney *et al.*, 2015, Mason & Setlow, 1986). Wie bereits diskutiert besitzen *C. perfringens* und *C. botulinum* drei

fast identischen SASPs und *B. subtilis* neben zwei fast identischen, noch 14 weitere SASPs. Aufgrund recht unterschiedlicher Aminosäuresequenzen der SASPs von *C. acetobutylicum*, zueinander (4.1), galt es zu untersuchen, ob daraus verschiedene Funktionen in den Sporen abgeleitet werden können.

Die dazu generierten sechs SASP-Insertionsmutanten von *C. acetobutylicum* ließen hinsichtlich der wachstumsphysiologischen Charakterisierung und der Sporenbildung keine Unterschiede zum Typstamm erkennen (3.5.1, 3.5.2) (Wetzel, 2012). Des weiteren waren alle Stämme befähigt morphologisch unveränderte, überdauernde Sporen auszubilden, als auch den Keimungsprozess der Sporen einzuleiten, indem diese ca. zweifach vergrößert waren und der Cortex hydrolysiert werden konnte.

Bei den Analysen zur Hitzeresistenz von *C. acetobutylicum* Sporen, zeigte die *sspD* Mutante eine signifikant verringerte Resistenz gegenüber 80 °C ($p \leq 0,05$). Für die Auswertung der Resistenzen wurde die dezimalen Reduktionszahl herangezogen (Mazolla *et al.*, 2003). Da jedoch das Hitzestress-Experiment nicht wie erwartet zu einer exponentiellen Abtötungskurve führte (Krämer, 2002), wurden die Daten einem D-Wert angenähert. Interessanterweise konnte für *Clostridium* sp. RKD Sporen bei einem Hitzestress von 70 °C, 80 °C und 90 °C ein ähnliches Ergebnis demonstriert werden, indem die Kurven nicht der Reaktion 1. Ordnung folgten (Dixit *et al.*, 2006). Eine Erklärung dahingehend war, dass die Sporenpopulation aus mehreren Populationen besteht, die jeweils unterschiedliche Inaktivierungskinetiken aufweisen. Eine Heterogenität von Sporen könnte auch die auftretenden Kurven von *C. acetobutylicum* erklären. Genaue Untersuchungen dahingehend gibt es jedoch bislang nicht. Weitere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe können bisher nur die nicht linearen Überlebenskurven der *C. acetobutylicum* Sporen bestätigen (Stecker, 2012; Gründlich 2015; Potratz, 2015).

Die *sspD* Mutante zeigte weiterhin auch bei den Keimungsanalysen ihrer Sporen in Flüssigkultur stets verringerte Wachstumsraten. Demnach kann dem SspD von *C. acetobutylicum* durchaus eine Funktion bei der Resistenz und Keimungsfähigkeit von Sporen zugeschrieben werden. Die SspF-Insertionsmutante zeigte zwar geringe Defizite bei den Keimungsanalysen auf Festmedium, jedoch eine genaue Funktion für die Hitzeresistenz und Keimungsfähigkeit von Sporen kann dem Protein nicht zugewiesen werden.

Auffällig war, dass bei den Keimungsanalysen von Sporen in Flüssigmedium, bis auf die *sspA* Mutante, bei allen Stämmen und auch beim *C. acetobutylicum* Wildtyp ein signifikant

verspäteter Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase nach einer 80 °C- bzw. 65 °C-Behandlung der Sporen einsetzte. Demnach konnten hitzebehandelte Sporen erst sechs bis acht Stunden später in die exponentielle Wachstumsphase eintreten, wohingegen unbehandelte Sporen bereits nach zwei Stunden diese erreichten. Eine mögliche Erklärung für diese Verzögerung ist, dass nach den Hitzebehandlungen ein Großteil der Sporen inaktiviert wird. So konnte für *B. subtilis* demonstriert werden, dass nach einer Hitzebehandlung von 85 °C für 10 min nur 53 % der Sporen in der Lage waren die Keimung einzuleiten und nur 36 % überhaupt aus den Sporen auswachsen konnten (Pandey *et al.*, 2013). Eine dadurch verringerte Anzahl auskeimender Sporen könnte die Verzögerung im Wachstum verursachen. Bei intakten Sporen wirkt sich Hitzestress nicht durch eine DNA-Schädigung oder durch oxidativen Stress aus (Setlow, 2006), sondern ist assoziiert mit einer Inaktivierung von Enzymen und Proteindenaturierungen (Reineke, 2013). Die verursachten Schäden müssen zunächst repariert werden, um eine Auskeimung zu gewährleisten, aber es ist unklar, ob sich die Sporen von den Schäden erholen können (Johnson & Busta, 1984).

Interessanterweise führt bei *B. subtilis* eine 65 °C-Behandlung zu einer verbesserten und schnelleren Keimung (Leuschner & Lillford, 1999) und gilt daher als Methode der Sporenaaktivierung (Vary & Halvorson 1968; Zhang *et al.*, 2009). Für den *C. acetobutylicum* Wildtyp konnte jedoch auch nach einer 65 °C-Behandlung eine verzögertes Wachstum beobachtet werden. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass bereits diese Temperatur einen negativen Einfluss auf die Sporen hat. Analysen hinsichtlich unbehandelter *B. subtilis* Sporen zeigten, dass 85 % in der Lage waren zu neuen Zellen auszuwachsen (Pandey *et al.*, 2013). Solch ein Ergebnis könnte auch für die unbehandelten Sporen von *C. acetobutylicum* sprechen, da bereits nach zwei Stunden ein exponentielles Wachstum einsetze und indiziert, dass ein Großteil der Sporen keimungsfähig war.

Eindeutig war eine Funktion von SspA (Cac2365) für die Sporen von *C. acetobutylicum*, denn Keimungsanalysen von Sporen der entsprechenden *sspA* Mutante ermöglichen keine Ausbildung von Kolonien auf Festmedium und Analysen in Flüssigkultur zeigten unter allen getesteten Bedingungen kein mögliches Wachstum aus den Sporen. Anhand von transmissionselektronenmikroskopischen und phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen konnte in nur in 10 - 15 % der Fälle eine neue vegetative Zellen in den Sporen der Mutante nachgewiesen werden (3.6). Deren Entwicklung scheint jedoch nicht vollständig abgeschlossen werden zu können, da im Vergleich zum Wildtyp, keine Motilität der Zellen

beobachtet werden konnte. So verblieben die neuen Zellen noch im bzw. direkt neben dem geöffneten Sporangium, wohingegen sich die neuen Zellen des Wildtyps frei im Medium bewegen konnten. Auch eine erste Zellelongation, wie beim *C. acetobutylicum* Wildtyp, konnte bei den Zellen der *sspA* Mutante nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Beobachtung, galt es zu klären, was die stagnierende Entwicklung der neu ausgebildeten Zellen der *sspA* Mutante verursacht (4.6).

4.6 Die *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*

4.6.1 Gehalt an Dipicolinsäure in *C. acetobutylicum* Endosporen

Zwischen den Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* gibt es Unterschiede hinsichtlich der DPA-Synthese. Wohingegen bei *B. subtilis* die Oxidation von 2,3-Dihydro-DPA (DHDPA) zu DPA durch die zwei Untereinheiten SpoVFA/B der DPA-Synthetase erfolgt, konnten die entsprechenden Gene bei einigen Vertretern der Clostridien nicht nachgewiesen werden (Dürre, 2014). Hier konnte für *C. perfringens* gezeigt werden, dass die DHDPA-Oxidation durch das Elektronen-Transfer-Flavoprotein EtfA katalysiert wird (Orsburn *et al.*, 2010).

Die Dipicolinsäure hat einen entscheidenden Einfluss auf die Hitzeresistenz und Stabilität von Sporen, indem sie den Wassergehalt im Kern herabsetzt und die Sporen-DNA schützt (Setlow, 2006). Aufgrund nachzuweisender Keimungsdefizite von Sporen der *sspD* und *sspF* Mutante und dem dazu drastischen Vitalitätsverlust der *sspA* Mutante (4.5), wurden alle generierten SASP-Insertionsmutanten vergleichend zum Wildtyp von *C. acetobutylicum* auf ihren Dipicolinsäuregehalt untersucht. Dabei ließen sich allerdings keine veränderten DPA-Werte vergleichend zum Typstamm ermitteln, weshalb die auftretenden Defizite durchaus dem jeweilig ausgeschalteten SASP zugesprochen werden können.

4.6.2 Analysen zum Sporenmantel und zur DNA in Endosporen

Im Zuge der Diplomarbeit (Wetzel, 2012) konnte ein mutmaßlich deformierter Sporenmantel bei Sporen der *sspA* Mutante beobachtet werden. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht bestätigen, da weitere Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der *sspA* Mutante normale und für *C. acetobutylicum* typische Sporen zeigten (3.6). Dennoch wurde eine Entmantelung der Sporen vorgenommen, um einen eventuellen Einfluss auf den Defekt der *sspA* Mutante auszuschließen. Dabei lässt eine Entmantelung immer noch eine Nährstoff-

induzierte Keimung zu (Paidhungate & Setlow, 2000) und hat keinen Einfluss auf Enzyme im Sporenkern (Paredes-Sabja, 2009). Die chemisch entmantelten Sporen der *sspA* Mutante waren ebenso wie deren unbehandelte Sporen nicht in der Lage Kolonien auszubilden. Entmantelte Sporen des Wildtyps hingegen zeigten eine hohe Keimungsfähigkeit. Folglich konnte ein veränderter Sporenmantel als Kriterium für den Vitalitätsverlust der *sspA* Mutante ausgeschlossen werden.

Um weitere Ursachen für die stagnierende Entwicklung der neuen Zellen der *sspA* Insertionsmutante zu ergründen, wurde die Sporen-DNA isoliert und analysiert. Da der Aufschluss von Sporen nicht trivial ist, kam es zum Einsatz eines FastPrep®-Homogenisators, wodurch die Sporen aufgebrochen werden konnten. Die harsche Lyse hat eine teilweise Fragmentierung der DNA zur Folge (Torok, 2003; Bakken & Frostegård, 2006), die jedoch von genügender Qualität für PCR-Analysen oder Southern Hybridisierungen ist (Vendeventer *et al.*, 2011; Ogram *et al.*, 1987). Aus den Wildtyp- und den SspA-Mutantensporen ließen sich gleiche Mengen an genomischer DNA isolieren, die bei beiden Stämmen soweit intakt war, um sie mittels PCR zu amplifizieren. Die analysierten PCR-Fragmente zeigten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *sspA* Mutante.

Gegen die Theorie einer DNA-Schädigung hervorgerufen durch fehlende SASPs spricht, dass unbehandelte *B. subtilis* Sporen, in denen die zwei Haupt-SASPs ($\alpha^- \beta^-$) ausgeschaltet wurden, vernachlässigbare DNA-Schädigungen von lediglich 1 % aufwiesen, die durch deren Ernte und Aufreinigung bedingt waren (Young & Setlow, 2003). Weiterhin hatte das Ausschalten aller drei Haupt-SASPs ($\alpha^- \beta^- \gamma^-$) von *B. subtilis* auch keinen Einfluss auf den Wassergehalt von Sporen (Hackett & Setlow, 1988). Wird jedoch ebenso die Dipicolinsäure-Synthese inaktiviert ($\alpha^- \beta^- \text{DPA}^-$) (Setlow *et al.*, 2006), verlieren die Sporen sehr schnell ihre Vitalität (>90 % innerhalb von 10-15 h bei 37 °C). Demgegenüber sind Sporen, denen es nur an DPA oder nur α/β -Typ SASPs mangelt, für Wochen bis Jahre stabil. So verlieren Sporen der $\alpha^- \beta^-$ Mutante von *B. subtilis* erst nach 2 Jahren ~90 % ihrer Stabilität (Setlow *et al.*, 2006).

Für die SspA-Defektmutter von *C. acetobutylicum* konnte ein Mangel an Dipicolinsäure als Ursache für die ausbleibende Koloniebildung ausgeschlossen und somit auch eine erhöhte Schädigung der DNA weitestgehend entkräftet werden. Dies wird weiterhin dadurch gestützt, dass selbst unter optimalen Bedingungen ausgebildete und gelagerte Sporen, die keinen Aufreinigungsschritten oder zusätzlichen Stressoren ausgesetzt waren, zu einem erneuten Wachstum in Flüssigkultur nicht befähigt waren (Abb. 7.11; Anhang).

4.6.3 Regulation der SASPs auf Transkript-und Proteinebene

In *B. subtilis* konnte eine regulatorische Rückkopplung zwischen zwei Haupt-SASPs aufgedeckt werden, wonach es in einer SASP- α -Defektmutante zu einer zweifachen Erhöhung des Transkriptlevels an SASP- β kam und ebenso *vice versa* (Mason & Setlow, 1986; Mason & Setlow, 1987). Diese Regulation dient in *B. subtilis* der Aufrechterhaltung einer konstanten Menge an Haupt-SASPs (Mason *et al.*, 1988a, b).

In *C. acetobutylicum* ließ sich eine derartige Regulation der SASPs auf Transkriptebene nicht nachweisen. Ein semiquantitativer Vergleich der mRNA Transkripte zwischen der *sspA* Mutante und dem Wildtyp zeigte für keines der anderen *ssp* Gene ein signifikant erhöhtes Transkriptlevel.

Daraus ableitend stellte sich die Frage, ob und wie viele Haupt-SASPs in *C. acetobutylicum* überhaupt für eine derartige Regulation zur Verfügung gestanden hätten. Um diese Frage zu beantworten, wurden die SASPs aus den Sporen des *C. acetobutylicum* Wildtyps isoliert. Des Weiteren wurde eine Rückkopplung auch auf Proteinebene untersucht, indem vergleichend die SASP-Proteine aus Sporen der *sspA* Mutante isoliert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass in Sporenextrakten des *C. acetobutylicum* Wildtyps nur ein einziges Haupt-SASP vorkommt, welches als SspA (Cac2365) identifiziert werden konnte (Tab. 7.4; Anhang). Weitere SASPs konnten neben dem dominierenden SspA nur zu sehr geringen Anteilen als SspB und SspH bestätigt werden (siehe Tab. 7.4; Anhang). Im Hinblick auf analysierte SASP-Proteine von Sporenbildnern, ist das Ergebnis von *C. acetobutylicum* bisher einzigartig. Vergleichend dazu konnten bei *B. subtilis*, *B. megaterium* und bei *C. bifermentans* jeweils zwei Haupt-SASPs (SspA/SspB; SspA/SspC; SASP- α /SASP- β) nachgewiesen werden, die dabei zu gleichen Anteilen in den Sporenextrakten vorlagen (Johnson & Tipper, 1981; Setlow, 1975b; Cabrera-Martinez *et al.*, 1989).

Die untersuchten Sporenproteine der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* bestätigten, dass auch auf Proteinebene eine Rückholung der SASPs nicht erfolgt, denn interessanterweise konnte keines der SASPs von *C. acetobutylicum* in den Sporenextrakten nachgewiesen werden. Eine fehlende Rückkopplung der SASPs könnte dadurch begründet sein, dass *C. acetobutylicum* keine zwei nahezu identischen SASPs besitzt (4.1), um eine gegenseitige funktionelle Kompensation zu ermöglichen. Eine andere mögliche Ursache könnte die Proteinverteilung sein, denn in *C. acetobutylicum* liegen keine zwei SASPs in gleichen

Mengen vor. In Bezug darauf sind in *B. subtilis* SASP- α und SASP- β zu ungefähr gleichen Anteilen als Haupt-SASPs in den Sporen vertreten (Setlow, 1975b). Es ist jedoch schwierig genaue Gründe für eine fehlende Rückkopplung zu ermitteln, da selbst in *B. subtilis* die Regulation bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden konnte. Deletionen stromaufwärts der *ssp* Promotoren hatten keinen Einfluss auf deren Proteinexpression (Farjado-Cavazos *et al.*, 1991). Es wird nur gemutmaßt, dass die Regulation in *B. subtilis* über den Abbau der jeweiligen *ssp* mRNA erfolgt (Mason *et al.*, 1988b), da mRNAs von SASP- α und - β eine längere Halbwertszeit (11 min) als andere mRNAs in den Zellen (6 min) besitzen (Leventhal & Chambiss, 1982). Eine Leader-Sequenz vor dem SASP- β -Gen konnte jedoch als Faktor für die mRNA Stabilität oder für die Regulation nicht bestätigt werden (Farjado-Cavazos *et al.*, 1991).

4.6.4 Komplementationsversuche der *sspA* Mutante

Das polare Effekte aufgrund der Insertion eines Gruppe II Introns in das Genom der *sspA* Mutante die Ursache für eine ausbleibende Koloniebildung sind, konnte bereits während der Diplomarbeit (Wetzel, 2012) widerlegt werden. So ermöglichte eine Plasmid-gestützte Komplementation die erneute Bereitstellung des *sspA*-Gens unter Kontrolle des nativen *sspA*-Promotors in der Mutante und führte zur Ausbildung hitzeresistenter Sporen mit Keimungs-raten ähnlich des *C. acetobutylicum* Typstamms.

Analysen dieser Arbeit zeigten, dass unter den gegebenen Bedingungen in *C. acetobutylicum* keines der anderen SASPs in der Lage war den Funktionsverlust von SspA zu kompensieren (4.6.3), was dadurch begründet sein könnte, dass deren Anteil in den Sporen zu gering war. Daher stellte sich die Frage, ob artifiziell die Expression eines der SASPs erhöht werden kann, um den Vitalitätsdefekt der *sspA* Mutante aufzuheben.

Bis auf Tlp, konnten für alle SASPs von *C. acetobutylicum* DNA-Schutzfunktionen demonstriert werden (4.2). Daher wurden SspB, SspD, SspF und SspH in Komplementations-versuche eingesetzt, indem sie unter Kontrolle ihrer jeweils nativen Promotoren, als auch unter Kontrolle des *sspA*-Promotors in den Sporen der *sspA* Mutante bereitgestellt werden sollten. Die Analysen ergaben, dass die SASPs unter Kontrolle ihrer jeweils nativen *ssp*-Promotoren nicht in der Lage waren der Vitalitätsverlust der *sspA* Mutante aufzuheben. Demnach scheinen die *ssp*-Promotoren von *sspB*, *sspD*, *sspF* und *sspH* zu schwach zu sein, um ausreichend SASP-Protein in den Sporen bereitzustellen. Demgegenüber zeigten die Versuche der SASPs unter Kontrolle des *sspA*-Promotors, das SspF in der Lage war die Vitalität der *sspA* Mutante

wiederherzustellen. Zwar war die Ausbildung hitzeresistenter Sporen signifikant verringert ($p \leq 0,001$) und deren Auskeimung verzögert (Tab. 3.7), aber dennoch zeigt der Versuch, dass ein anderes SASP von *C. acetobutylicum* prinzipiell in der Lage wäre die Funktion von SspA zu übernehmen. Es bleibt daher weiterhin fraglich, warum in *C. acetobutylicum* keine ausreichende Expression der anderen SASPs gewährleistet wird.

Für das SspF-Protein konnte im Vergleich zum SspA von *C. acetobutylicum* eine nur 18 %ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz ermittelt werden (Tab. 7.3; Anhang). Demnach scheint die jeweilige Funktion des SASP-Proteins ausschlaggebend zu sein und nicht ob die SASP-Proteine zueinander sehr ähnlich sind. So konnten für SspA, SspB, SspD und SspF von *C. acetobutylicum* auch ähnlich effiziente DNA-Schutzfunktionen demonstriert werden (4.2). Das SspF-Protein ist zwar signifikant vergrößert (3.1), zeigt aber alle Aminosäurereste, die auch die anderen SASPs von *C. acetobutylicum* aufweisen (siehe Abb. 7.4; Anhang). Somit kann ausgeschlossen werden, dass nur SspF in der Lage gewesen wäre essentielle Aminosäurereste für die sich entwickelnde *sspA::int*-Zelle bereitzustellen.

Aufgrund der verringerten Keimungsraten liegt nahe, dass SspF im Vergleich zu SspA geringfügiger in den Sporen bereitgestellt wurde. Es konnte jedoch keine Aussage getroffen werden, wie stark SspF exprimiert wurde, da Western Blot-Analysen keinen Proteinnachweis zeigten. Dahingehend ist zu erwähnen, dass die SASP-Expressionen in *E. coli* unter Kontrolle des konstitutiven Thiolase-Promotors sehr gering waren und bis zu sechsmal wiederholt werden mussten, um ausreichend Protein zu gewährleisten (3.3.2). Der für die Komplementation verwendete *sspA* Promotor ist nicht konstitutiv und wird nur während der frühen Sporulation aktiv (Abb. 4.1). Seine Aktivität in *C. acetobutylicum* reichte sehr wahrscheinlich nicht aus, um genügend SspF-Protein für eine Detektion im Western Blot zu generieren.

4.6.5 SspA in *C. acetobutylicum* Endosporen

Die immunelektronenmikroskopischen Analysen unter Verwendung des polyklonalen Anti-SspA-Antikörpers konnten die zuvor ermittelten *in vitro* Bestimmungen zum SASP-Gehalt in *C. acetobutylicum* Endosporen (4.6.3) bestätigen. Demnach waren in den Wildtyp-Sporen durchschnittlich 231 SASP-Antigene und in Sporen der *sspA* Mutante nur 17 SASP-Antigene nachzuweisen. Aufgrund der Differenz zwischen Wildtyp und *sspA* Mutante kann folglich davon ausgegangen werden, dass der Anteil von SspA an gesamtnachweisbaren SASPs über 90 % (genau 92,64 %) beträgt. Vergleichend dazu liegen in *B. subtilis* Sporen die drei Haupt-

SASPs in einem Verhältnis von 18 % an SASP- α , 18 % an SASP- β und 36 % an SASP- γ vor (Johnson & Tipper, 1981). Die Antigennachweise beim *C. acetobutylicum* Wildtyp waren dabei stets mit dem Sporennukleoid assoziiert, welches kompakt im Sporenkern zu erkennen war (Abb. 3.24, A). Demgegenüber waren kompakt angeordnete DNA-Strukturen in Sporen der *sspA* Mutante kaum ersichtlich und die wenigen SASP-Antigene diffus im Sporenkern verteilt (Abb. 3.24, B). Diese Erkenntnis spricht dafür, dass die SASPs aufgrund ihrer DNA-Bindung maßgeblich für eine dicht gepackte Bündelung der Sporen-DNA verantwortlich sind, wie es auch durch Dittmann *et al.* (2015) bei *B. subtilis* demonstriert werden konnten (Abb. 4.2). Demnach waren hochgeordnete DNA-Strukturen, in Form eines kristallinen Nukleoids nur in den Wildtypsporen nachzuweisen (Abb. 4.2, A), aber nicht in Sporen, denen es an den drei Haupt-SASPs von *B. subtilis* (SASP- α , - β und - γ) mangelte (Abb. 4.2, B).

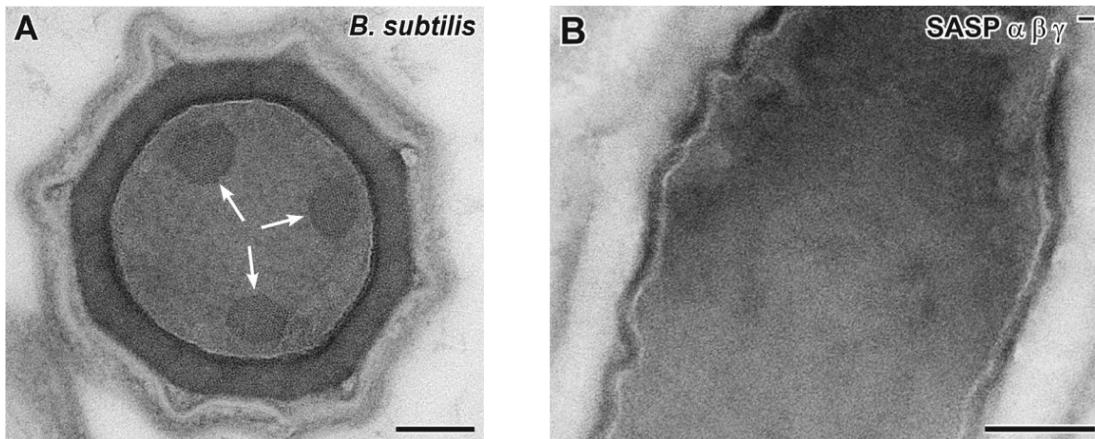


Abb. 4.2. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Sporen des Wildtyps und der $\alpha\beta\gamma$ -Mutante von *B. subtilis* (Dittmann *et al.*, 2015). A) Kristalline Kernregionen in Sporeschnitten des Wildtyps sind durch die Pfeile gekennzeichnet. B) Sporen der $\alpha\beta\gamma$ -Mutante waren frei von geordneten Strukturen. Größenbalken: 100 nm.

Derartig hochauflösende TEM-Aufnahmen (50-100 nm) für die Darstellung einer kristallinen Nukleoidstruktur (Abb. 4.2, A) (Dittmann *et al.*, 2015) ließen sich am Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock für *C. acetobutylicum* (200-500 nm) nicht erzielen. Dennoch konnte im Hinblick auf die Kompaktheit der genomischen DNA in den Sporen des Wildtyp und der SspA-Defektmutante deutlich differenziert werden.

Bei der *sspA* Mutante konnte eine stagnierende Entwicklung beobachtet werden, indem ~80 % der Sporen über das Stadium lichtmikroskopisch dunkel erscheinender Sporen nicht hinauskamen und in nur 10-15 % der Fälle eine neue Zelle beobachtet werden konnte, die an Vitalität verloren hatte. Als Ursachen konnten wie bereits diskutiert der Gehalt an Dipicolin-

säure, eine veränderter Sporenmantel, als auch eine Schädigung der Sporen-DNA ausgeschlossen werden. Daher könnte der Grund für den Vitalitätsverlust ein zu geringer Gehalt an SASPs in den Sporen der Mutante sein.

Die Phase in der die Sporen bzw. die wenigen Zellen der *sspA* Mutante stagnierten wird als Reifung bezeichnet und erfolgt nach der Sporenkeimung und noch vor dem Auswachsen und einer ersten Zellelongation (siehe Abb. 4.3) (Sinai *et al.*, 2015). In dieser Phase werden alle Ressourcen der Spore genutzt, um ein Auswachsen der neuen Zelle zu ermöglichen. Aufgrund der molekularen Reorganisation ist sie daher durch keine morphologischen Veränderungen gekennzeichnet. Die Reifung wird dabei maßgeblich von dem verfügbaren Reservoir an RNA und 3-Phosphoglycerat, aber auch Proteindynamiken wie dem Abbau der SASPs beeinflusst (Segev *et al.*, 2012, 2013).

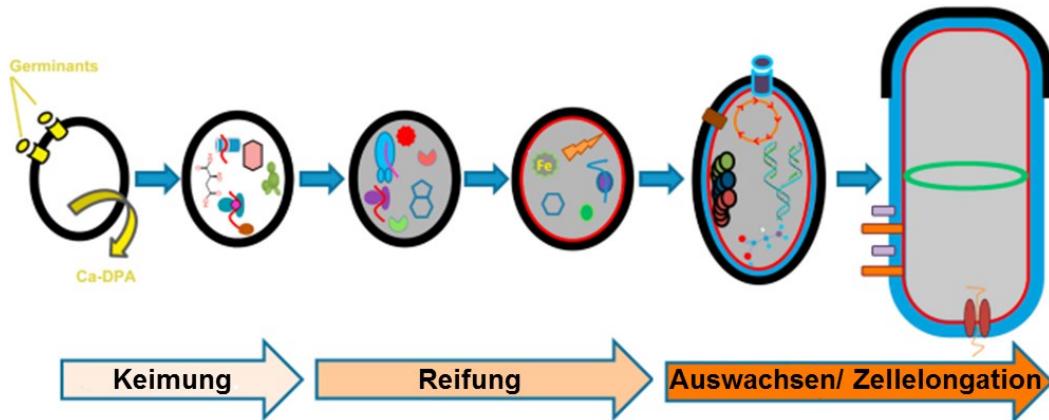


Abb. 4.3: Zeitabhängige molekulare Wiedererweckung einer bakteriellen Spore (Sinai *et al.*, 2015; mod.). Erläuterungen siehe Text.

Versuche in *B. subtilis* zeigten, dass die Länge der Reifungsphase von der Aminosäurebereitstellung durch SASPs abhängig ist (Segev *et al.*, 2013). Die Spore kann während der Entwicklung keine Ressourcen aus der Umgebung nutzen und ist auf das Reservoir in der Spore angewiesen (Sinai *et al.*, 2015). Da diese Ressourcen aber limitierend sind braucht die sich entwickelnde Zelle eine schnelle Bereitstellung von Transportproteinen für die Aufnahme weiterer Metaboliten und Cofaktoren aus der Umgebung, um den Energie-Stoffwechsel, eine Zellteilung und Motilitäts-Gene zu gewährleisten (Bassi *et al.*, 2013; Dembek *et al.*, 2013).

B. subtilis Sporen denen es an den drei Haupt-SASPs mangelt ($\alpha\beta\gamma$), besitzen noch 20-25 % an restlich vorhandenen SASPs (Setlow *et al.*, 1998; Hayes *et al.*, 2001; Kosman & Setlow, 2003). Diese Sporen waren, auch wenn verzögert, in der Lage Kolonien auszubilden und in Flüssigkulturen anzuwachsen (Hecket & Setlow, 1988; Ruzal *et al.*, 1994; Tovar-Rojo *et al.*,

2003; Loshon *et al.*, 2006). Vergleichend dazu konnten in Sporen der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* nur 7,4 % an noch vorhandenen SASPs nachgewiesen werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass eine für die Entwicklung der Zelle kritische Menge an SASPs unterschritten wurde. Vergleichende Zahlen an notwendigen SASPs für ein Wachstum liegen jedoch nicht vor. Für die wenigen Zellen der SspA-Defektmutter konnte weder eine Motilität, noch eine erste Zellelongation beobachtet werden, was sonst typisch für Clostridien-Zellen ist (Dembek *et al.*, 2013) und für den *C. acetobutylicum* Wildtyp gezeigt werden konnte (Abb. 3.18, A, 8). Dabei scheint deren Entwicklung nicht ausreichend vorangeschritten zu sein, um wichtige Transportproteine auszubilden und die notwendige Energie aus dem umgebenden Medium aufzunehmen zu können. Es liegt nahe, dass aufgrund der limitierenden Ressourcen der Metabolismus der neuen Zelle nicht aufrecht gehalten werden konnte und letztendlich zum Erliegen kam.

In Bezug auf SASP-Defektmutanten anderer Sporenbildnern konnte ein Ergebnis, wie für die *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* bisher nicht gezeigt werden. Mutanten von *C. botulinum*, *C. perfringens* und auch von *B. subtilis* in denen die entsprechenden SASPs einzeln, doppelt oder sogar dreifach ausgeschaltet wurden, waren stets in der Lage aus ihren Sporen auszuwachsen (Meaney *et al.*, 2015; Raju *et al.*, 2006, 2007; Li *et al.*, 2009; Leyva-Illades *et al.*, 2007; Mason & Setlow, 1986; Hecket & Setlow, 1988). Ergebnisse zu den SASP-Verhältnissen liegen nicht für alle Stämme vor, aber im Vergleich zu *B. subtilis* konnten im Rahmen dieser Arbeit deutliche Unterschiede für *C. acetobutylicum* aufgezeigt werden.

4.7 Germinations-spezifische Proteasen von *C. acetobutylicum*

Lange Zeit galt als einzig aktives und spezifisch SASP-abbauendes Enzym die Germinationsprotease GPR (Setlow *et al.*, 1980). Wie jedoch die Spaltung der SASPs erfolgt, blieb lange Zeit unbekannt, bis 2005 aufgrund einer Kristallstruktur und Aminosäureaustauschen die GPR als atypische Aspartatprotease klassifiziert werden konnte (Carroll & Setlow, 2005). Es wurde allerdings eine weitere SASP-abbauende Aktivität vermutet, da GPR-Defektmutanten zwar verlangsamt, aber dennoch in der Lage waren SASPs abzubauen und aus Sporen anzuwachsen (Postemsky *et al.*, 1978, Sanchez-Salas *et al.*, 1992). Expressions-Analysen lenkten die Aufmerksamkeit auf ein YyaC-Protein, welches ähnlich reguliert ist (Steil *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006) und gleiche katalytische Aspartatreste wie eine GPR aufweist (Carroll, 2008).

Aufgrund dieser Erkenntnis konnte darauf geschlossen werden, dass es im Genom von *C. acetobutylicum* eine GPR und auch eine YyaC geben sollte. Durch Ähnlichkeits-Analysen gegen das Genom von *B. megaterium* konnten zwei Proteine aufgrund von signifikanten Proteinähnlichkeiten einer GPR (Cac1275) und einem YyaC-Protein (Cac2857) zugesprochen werden (3.4.1). In Bezug auf deren Transkription wird im Gegensatz zu *B. subtilis* (Sussman & Setlow, 1991) die GPR in *C. acetobutylicum* nicht von σ^F , sondern von σ^G reguliert (Jones, 2011) und bildet ein mutmaßliches Operon mit *spoIIIP* (Paredes *et al.*, 2004). Microarray-Analysen von Jones *et al.* (2008) bestätigten, dass die Induktion des *gpr*-Gens, als auch des *yyaC*-Gens von *C. acetobutylicum* nach der Transitionssphase erfolgt (Abb. 4.4). Demnach ist deren Transkription in etwa zeitgleich mit den SASPs von *C. acetobutylicum* (4.4).

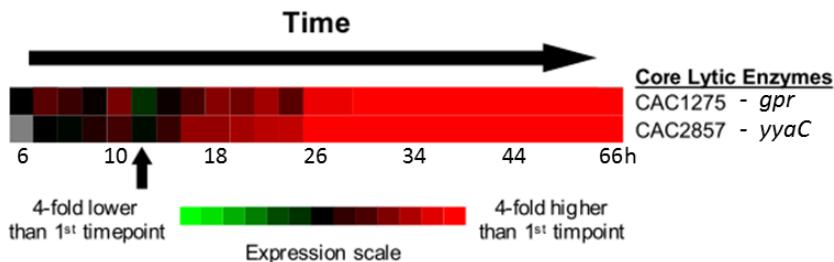


Abb. 4.4: Expressionsprofil von Genen in *C. acetobutylicum*, die mit der Keimung assoziiert sind. (Jones *et al.*, 2008, mod.). Der Pfeil (\uparrow) kennzeichnet den Beginn der Transitionssphase.

Genomanalysen von Galperin *et al.* (2012) zeigten, dass die meisten *Bacillus*-Vertreter ein *gpr*- und ein *yyaC*-Gen aufweisen, viele Vertreter der Clostridien hingegen ein *gpr*-Gen, aber mehrere *yyaC*-Gene. Anhand von Ähnlichkeits-Analysen (Cummings *et al.*, 2002) konnten im Genom von *C. acetobutylicum* demnach drei weitere hypothetische *yyaC* Gene (*cac1959*, *cac1960*, *cac3727*) ermittelt werden. Auch *C. perfringens* und *C. botulinum* besitzen ein zusätzliches hypothetisches *yyaC* Gen. Vergleicht man die entsprechenden Aminosäuresequenzen dieser putativen Proteine in einem Alignment mit annotierten GPR und YyaC-Proteasen (Abb. 4.5), so zeigt sich, dass diese Proteine nur entfernt ähnlich zu YyaC sind und sich auch von den GPR unterscheiden. Die stärksten Abweichungen zeigen dabei *Cac1959*, welches aufgrund fehlender Aspartatreste wohlmöglich inaktiv ist (Abb. 4.5).

Einen Beweis, dass die Proteine *Cac1960* und *Cac3727* von *C. acetobutylicum* keine typischen Germinationsproteasen darstellen, konnte durch Lunze (2014a) erbracht werden. Demnach waren beide Proteine bereits bei der Expression in *E. coli* aktiv und dabei wirtsschädigend. Des Weiteren konnte eine GPR-typische Abspaltung eines N-terminalen Propeptids nicht nachgewiesen werden und auch eine SASP-Substratspezifität war nicht gegeben.

entfernt ähnlich	Clost	Cac CAC1959	31 VVICIGDPVFEGLNIALP-LVGTLLHER-----NIPNVYGTI-20-DNPYIILVASSFPVDFH--DEREV-11-TASGSLK 126-177
		Cac CAC1960	45 VILSLGVDTLVGDSLGP-LVGSILKRN-----GIPNVYGTI-20-KNPYIILVVDAAVTANN--INDIV-11-VYRQLPT 140-194
YyaC	Bac	Cpe BAB82355	37 VFICIGSDRSTGDSLGP-LIGEKIRFL----SKNNIFIYGTI-20-KKPFIIAIDACLGAVDN--VGHVL-11-LNKDLPE 134-196
		Cbo WP_012048448	37 VVICIGTDRSTGDSLGP-LVGEKLKF-----IRGRVTLFGNL-20-KNPYIIAIDACLGSIQN--IGKII-11-VNKNLPA 134-193
YyaC	Bac	Cac CAC3727	36 VFICIGTDRSTGDSLGP-MVGYKLTKF-----HKNNLIVFGTL-20-ENPFIIIAIDACLGSTKT--VGNIV-11-MNKS LPT 133-195
		Bme ADF42057	45 VFVCIGTDRSTGDSLGP-LVGTKLNEK-----KVSSFHIFGTL-19-PNPFIIGIDACLGRMKS--VGSAS-11-VNKE LPP 142-206
YyaC	Bac	Bsu YYAC_BACSU	46 VVVICIGTDRSTGDSLGP-LVGMKLRQM-----QLTRFHVYGTI-20-KNPFFIIAVDACLGRVKS--VGSFQ-11-VQKDLPE 143-205
		Bce NP_835133	46 ILVICIGTDRSTGDSLGP-LVGTKLEQI-----DIQNQVFGTL-20-PTAFIIIAVDACLGSQN--IGSIT-11-MNKKLPA 143-198
GPR	Clost	Cac CAC2857	29 IIIICIGTDRCIGDCLGP-MVGTMLKEK-----FFPLINVYGTI-19-TNSTIIGIDACLDGTEN--IGEIQ-11-VGKSLPD 128-188
		Cbo YP_001252711	30 IIIICIGTDRCIGDCLGP-LVGTILRYK-----NIPLKLYGTI-20-PNSIIIGIDACLGDKD N-IGQIQ-11-VGKTPLK 126-174
GPR	Clost	Cpe BAB81885	31 IIVCIGTDKCIGDCLGP-LVGTLLKEK-----FFPLKVF GTI-19-PGKYIIAIDACLGSNS--IGEIH-11-VGKS LRS 127-177
		Cdi CAJ66949	36 IIVCIGTDRAIGDTLGP-LVGTILKNS-----NFKPYVYGTI-20-IQGNFLAIDACLGSQN--IGNIQ-11-VGKKL P 132-175
GPR	Bac	Cpe GPR_CLOPE	101 LVVGLGNWNVTPDAIGPKVVGKLMVRH-11-SVRPCAIAPG-20-KPDLVVCIDALASRKLERVARTIQ-11-VGNHRMQ 213-325
		Cbo CAL84529	100 LVVGLGNWNVTA DALGPKVSKIMVRH-11-NVRPCVAISPG-20-KPDLVVCIDALASRKTRVNNTIQ-11-VGNKRME 212-324
GPR	Bac	Cac CAC1275	103 LVVGLGNWNVTPDSIGPKVIGKLMVRH-11-GIRPVCAVAPG-19-KPDLVVCIDALARCMGRVNTIQ-11-VGNMRME 218-327
		Cdi YP_001088984	101 LVVGLGNWNNTSDALGPKVSKTLVRH-11-DFTEVSA LSPG-20-KPDRVVAIDALASRKMERVNNTIQ-11-VGNTRKS 213-317
GPR	Bac	Bsu CAB14496	114 LIVGLGNWNVTPDALGPMAVENLLVTRH-11-GYRPSAFAPG-20-KPDFVIAIDALAAR AVERVNNTIQ-11-VGNKRKD 226-368
		Bce AAP11232	112 LIVGLGNWNVTPDALGPIVVENVLVRH-11-GFRPSA IAPG-19-NPDFVIAIDALAARSIE RVNNTIQ-11-VGNKRKE 224-367
GPR	Bac	Bme ADF41381	115 LIVGLGNLSVTPDALGP KAVDNLLTRH-11-GFRPSA IAPG-19-NPDFVIAIDALAARSIE RVNATIQ-11-VGNKRKE 227-370
		.. : * : .. : * : .. : .. :	.. : .. :

Abb. 4.5: Alignment von GPR und YyaC, sowie entfernt ähnlicher Proteine bei Vertretern ausgewählter Bacilli (Bac) und Clostridien (Clost). Hochkonservierte Aspartatreste (D, rot) von GPR und YyaC sind blau hervorgehoben. CAC1959 weist stattdessen die Aminosäurereste Asparagin (N) und Alanin (A) auf. Die jeweiligen Proteine von *C. acetobutylicum* sind rot unterlegt, wobei CAC1275 in GPR, CAC2857 in YyaC und CAC1959, CAC1960 und CAC3727 in entfernt ähnlich Proteine clustern. Cac: *C. acetobutylicum* ATCC 824, Cpe: *C. perfringens* str. 13, Cbo: *C. botulinum* ATCC 3502, Cdi: *C. difficile* CD630, Bme: *B. megaterium* DSM 319, Bsu: *B. subtilis* 168, Bce: *B. cereus* ATCC 14579.

Basierend auf der eindeutigen *in silico* Zuordnung von Cac1275 als GPR und Cac2857 als YyaC, fokussierte sich diese Arbeit auf diese beiden Proteine. Bisher konnte für eine YyaC-Protease weder Enzymaktivität gezeigt, geschweige denn eine proteolytische Spezifität untersucht werden, da deren Gewinnung aus *B. subtilis* nicht erfolgreich war und Untersuchungen von *E. coli*-Gesamtzelllysaten keine Aktivitätsnachweise zuließen (Carroll, 2008). Für *C. acetobutylicum* konnte sowohl die GPR (~36,5 kDa, inklusive Strep-Tag), als auch die YyaC-Protease (~22 kDa, inklusive Strep-Tag) in hoher Reinheit gewonnen werden (3.4.3). Bekannterweise liegt diese Klasse atypischer Aspartatproteasen als inaktive Vorstufe vor und wird später im Laufe der Sporulation durch die Abspaltung eines N-terminalen Propeptids aktiviert (siehe Abb. 1.6; Einleitung) (Sanchez-Salas & Setlow, 1993). In der Tat konnte, sowohl für GPR (~1 kDa), als auch für YyaC (~2 und ~4 kDa) eine Abspaltung von N-terminalen Propeptiden und demzufolge verkleinerte Proteasen von ~35,5 kDa (GPR) und ~20 kDa bzw. ~18 kDa (YyaC) nachgewiesen werden. Für die GPR von *C. acetobutylicum* stimmt das detektierte Propeptid von ~1 kDa mit dem zu erwartenden Propeptid von ca. 0,7 kDa (D7) überein, welches mutmaßlich an der konservierten Sequenz D↓LAVE abgespalten wird (Abb. 3.8). Die Propeptidlänge ist dabei nicht konserviert (Carroll, 2008). So sind clostridielle Propeptide sechs bis zehn Aminosäuren und die der Bacilli mit vierzehn bis fünfzehn Aminosäuren fast doppelt so lang. Dabei scheint ein Großteil dieser Aminosäuren nicht essentiell zu sein, denn bei *B. megaterium* konnten zehn der fünfzehn Aminosäuren ohne

Veränderungen auf Autoprozessierung oder SASP-Spezifität entfernt werden (Pedersen *et al.*, 1997).

Im Hinblick auf die YyaC von *C. acetobutylicum* konnte eine konservierte Aktivierungssequenz, wie bei der GPR, nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Auch weitere Ähnlichkeitsanalysen von YyaC-Proteinen verschiedener Bacilli oder Clostridien erbrachten keinerlei konservierte Sequenzen für eine mögliche Autoprozessierung (Abb. 7.10; Anhang). Dennoch wurden bei YyaC auffälliger Weise zwei Propeptide von ~2 und ~4 kDa abgespalten. Die relativen Lokalisationen der Aspartatreste D26/D27 und D37 (Abb. 3.8) könnten als Schnittstellen in Frage kommen, da sie die Größen der Propeptide erklären könnten. Ob jedoch tatsächlich die Aktivierung der YyaC von Aspartatresten abhängig ist, konnte im Zuge dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden. In Bezug darauf scheint der Aspartatrest D15 (D \downarrow LAVE) bei den GPR nicht essentiell für die Autoprozessierung zu sein. So konnte ein Austausch gegen die Aminosäure Glutamat (E15) die Autoprozessierung sogar beschleunigen (Illades-Aguiar & Setlow, 1994). Weitere Aminosäureaustausche zeigten, dass je ähnlicher die Sequenz der Erkennungssequenz der SASPs (E \downarrow IASE) wird, desto schneller erfolgt eine Autoprozessierung (Ponnuraj *et al.*, 2000). Eine SASP-ähnliche Sequenz konnte jedoch bei den YyaC-Proteinen ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 7.10; Anhang).

Eine Abspaltung der Propeptide wird durch intramolekulare Reaktionen ermöglicht, wobei der genaue katalytische Mechanismus bisher unbekannt ist (Carroll, 2008). Die Aminosäure Glutamat E19 (DLAVE) konnte als potentielles Nucleophil ausgeschlossen werden (Ponnuraj *et al.*, 2000). Es wird bisher gemutmaßt, dass die katalytischen Aspartatreste aufgrund einer Strukturänderung der GPR räumlich nahe genug an die Propeptidsequenz herankommen könnten, um eine intramolekulare Aktivierung zu ermöglichen (Carroll, 2008).

Für die YyaC von *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass die GPR-analogen Aspartatreste essentiell für eine Aktivität sind (Carroll, 2008). Da sowohl die YyaC, als auch die GPR von *C. acetobutylicum* diese katalytischen Aspartatreste aufweisen (Abb. 4.5) und zu einer Autoprozessierung befähigt waren, stellte sich die Frage, inwieweit diese aktiv sind und spezifisch SASPs spalten können (Setlow, 1976). Aufgrund dessen, dass die genauen Aktivierungssequenzen bei der GPR und bei der YyaC von *C. acetobutylicum* nicht bekannt waren, wurde eine modifizierte Methode nach Carroll (2008) angewandt, indem die Zymogene erst autoprozessiert und dann je nach ihrer Aktivität in der Lage waren die SASPs zu spalten (Wetzel & Fischer, 2015). Unter den gegebenen *in vitro* Bedingungen war die GPR bereits

nach fünf bzw. fünfzehn Minuten in der Lage die Substrate SspB und SspD zu spalten, wohingegen die YyaC-Protease erst nach jeweils einer Stunde dazu befähigt war. Eine Abspaltung der Propeptide konnte jedoch für beide Proteasen bereits in den ersten Minuten demonstriert werden (Abb. 7.9; Anhang). Demnach ist die GPR ca. fünf- bis vierzehnfach schneller in der Lage die SASPs zu spalten als die YyaC.

Ihre SASP-Substratspezifität wurde dahingehend bewiesen, dass beide Proteasen in angereichertem nativen *C. acetobutylicum* Sporenprotein spezifisch nur eine ~7 kDa Proteinbande abbauen konnten, die mittels MALDI-TOF als SspA (Cac2365) bestätigt wurde (Tab. 7.4; Anhang). Eine nicht-spezifische Proteaseaktivität in den Sporenextrakten selbst konnte ausgeschlossen werden. Des weiteren ließ sich ihre Substratspezifität auch anhand des alternativen Substrats der Vinylacetyl-CoA Delta-Isomerase von *C. beijerinckii* bestätigen, indem keinerlei Abbau des Enzyms nachgewiesen werden konnte.

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten von GPR und YyaC von *C. acetobutylicum* zu anderen GPR ist schwierig, da aufgrund der veränderten Methode viel höhere Mengen an Protein eingesetzt werden mussten. Denn es ist bekannt, dass unter diesen experimentellen Bedingungen nur eine Autoprozessierung von ~3 % ermöglicht wird (Carroll & Setlow, 2005). Demnach fällt die spezifische Aktivität der GPR von *C. acetobutylicum* mit 2,4 im Vergleich zur direkt aktiven GPR P₄₁ von *B. megaterium* mit 31,6 (Carroll, 2008) sehr gering aus. Auch die Aktivität der YyaC (SA= 0,167) ist vergleichend dazu dementsprechend niedrig.

Trotz der gewählten Bedingungen gibt es in Bezug auf den zeitlichen Abbau der SASPs hohe Übereinstimmungen zu *B. megaterium*. Für die aktiven GPR P₄₁ bzw. P₄₀ von *B. megaterium* konnte eine SASP-Spaltung frühestens nach fünf Minuten demonstriert werden und entspricht damit den Daten der GPR und SspB von *C. acetobutylicum*. Zwar spaltete die GPR von *C. acetobutylicum* das SspD erst nach fünfzehn Minuten, aber solch ein Ergebnis ist nicht ungewöhnlich. Auch bei *Bacillus* konnten unterschiedliche Substratspezifitäten der GPR ermittelt werden und waren das Resultat einer *in vitro* veränderten Faltung bzw. nicht optimaler Bedingungen im Vergleich zu *in vivo* (Setlow 1976, 1978). Weiterhin könnte die bisher unbekannte Aktivität in den GPR-Defektmutanten von *Bacillus* für die Aktivität der YyaC stehen. In den GPR-Defektmutanten wurden die SASPs erst nach >90 min (*B. megaterium*) bzw. >60 min (*B. subtilis*) abgebaut (Sanchez-Salas *et al.*, 1992). Dies entspricht dem experimentell ermittelten Zeitraum der YyaC von *C. acetobutylicum*, welche sowohl SspB, als auch SspD frühestens nach einer Stunde spalten konnte.

5 Zusammenfassung

1. *In silico* Analysen identifizierten im Genom von *C. acetobutylicum* sechs putative SASPs unterschiedlicher α/β-Typen. Dabei handelt es sich um CAC2365 (SspA), CAC1522 (SspB), CAC1620, (SspD), CAC2372 (SspF), CAC1663 (SspH) und CAC1487 (Tlp). Das SspH konnte erstmalig im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt werden.
2. Für alle *ssp* Gene konnten spezifische mRNA Transkripte während der frühen Sporulation nachgewiesen werden und waren abhängig von Spo0A, dem Masterregulator der Sporulation. Abgeleitete Promotorregionen der *ssp* Gene zeigten hohe Übereinstimmungen zu Konsensus-Sequenzen der Vorsporen-spezifischen Sigma-Faktoren σ^G (*sspA*, *sspB*, *sspD*, *sspF* und *sspH*) und σ^F (*tlp*).
3. Die rekombinante Gewinnung der SASP-Proteine aus *E. coli* war erfolgreich. Je nach Konservierung des DNA-Bindemotivs von α/β-Typ SASPs waren SspA, SspB, SspD und SspF mit 100 % Konservierung starke DNA-Bindeproteine und SspH mit 51 % Konservierung ein schwaches DNA-Bindeprotein. Für Tlp mit nur 31 % Konservierung ließ sich eine DNA-Schutzfunktion nicht bestätigen. Zudem zeigte das Tlp-Protein eine Oligomerisierung mit bisher unbekannter Funktion.
4. Insertionsmutanten der sechs SASPs ließen hinsichtlich der wachstumsphysiologischen Charakterisierung und der Sporenbildung keine signifikanten Unterschiede zum Typstamm erkennen. Alle Stämme waren befähigt einheitliche, überdauernde Sporen mit einem unveränderten Gehalt an Dipicolinsäure auszubilden. Auch eine Sporenkeimung war bei allen SASP-Mutanten vergleichend zum Wildtyp, durch ca. zweifach vergrößerte Sporen und einer Hydrolyse des Cortex, vorzuweisen.
5. Sporen der SspD-Insertionsmutante zeigten signifikant verringerte Resistenzen gegenüber 80 °C und verminderte Wachstumsraten in statischen Kulturen.
6. Die ausgebildeten Sporen der SspA-Insertionsmutante waren weder befähigt erneut zu Kolonien auszuwachsen, geschweige denn ein Wachstum in Flüssigkulturen zu ermöglichen. In ~80 % der Fälle wurde das Stadium lichtmikroskopisch dunkel erscheinender Sporen nicht überschritten. In nur 10-15 % der Fälle konnte eine primär aus dem Sporangium geschlüpfte neue Zelle beobachtet werden, die jedoch ihre Vitalität verloren hatte und keine Motilität oder Zellelongation aufwies. Als Ursachen konnten ein abnormaler Sporenmantel oder eine geschädigte Sporen-DNA ausgeschlossen werden.

7. Der Defekt der *sspA::int*-Mutante konnte Plasmid-gestützte durch eine Bereitstellung des nativen *sspA*-Gens unter Kontrolle des *sspA*-Promotors aufgehoben werden. Auch eine Bereitstellung des *sspF*-Gens unter Kontrolle des *sspA*-Promotors ermöglichte die Ausbildung hitzeresistenter Sporen und eine erneute Koloniebildung.
8. Eine regulatorische Rückkopplung der SASPs von *C. acetobutylicum*, für die Aufrechterhaltung einer konstanten Menge an Haupt-SASPs, konnte sowohl auf Transkriptebene, als auch auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden.
9. *In vitro* Bestimmungen zum SASP-Gehalt in *C. acetobutylicum* Endosporen, ließen nur ein einziges Haupt-SASP als SspA erkennen. In Sporen der entsprechenden *sspA::int*-Mutante konnte hingegen keines der SASPs von *C. acetobutylicum* nachgewiesen werden.
10. Immunelektronenmikroskopische Analysen unter Verwendung eines polyklonalen Anti-SspA-Antikörpers bestätigten die *in vitro* Bestimmungen zum SASP-Gehalt. In Wildtyp-Sporen konnten durchschnittlich 231 SASP-Antigene und in Sporen der SspA-Defektmutter nur 17 SASP-Antigene nachgewiesen werden. Aufgrund der Differenz liegt der Anteil von SspA an gesamtnachweisbaren SASPs in *C. acetobutylicum* Endosporen bei ca. 93 %. In Sporen der entsprechenden *sspA::int*-Mutante mit nur 7,4 % an noch vorhandenen SASPs, wurde eine kritische Menge unterschritten, die notwendig gewesen wäre, um eine vollständige Entwicklung der neuen Zellen gewährleisten zu können.
11. Durch *in silico* Analysen konnten im Genom von *C. acetobutylicum* zwei Germinations-spezifische Proteasen identifiziert werden, welche aufgrund signifikanter Proteinübereinstimmungen einer GPR (CAC1275) und einer YyaC-Protease (CAC2857) zugeordnet werden konnten. Deren rekombinante Gewinnung aus *E. coli* war erfolgreich. Beide Proteasen wurden als eine inaktive Vorstufe gebildet und konnten *in vitro* autokatalytisch aktiviert werden, indem GPR ein N-terminales Propeptid (~1 kDa) und YyaC zwei N-terminale Propeptide (~2 kDa und ~4 kDa) abgespaltete.
12. Sowohl bei GPR, als auch bei YyaC von *C. acetobutylicum* handelt es sich substratspezifische Proteasen, die nur in der Lage sind SASPs zu spalten und keine Aktivität gegenüber alternativen Substraten aufweisen. Die Aktivität der GPR war dahingehend fünf bis vierzehnfach höher, als die der YyaC. So konnte eine Spaltung von SspB und SspD durch GPR bereits nach fünf bzw. fünfzehn Minuten und durch YyaC erst nach jeweils einer Stunde demonstriert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine Enzymaktivität und proteolytische Spezifität einer YyaC-Protease demonstriert werden.

6 Literaturverzeichnis

Al-Hinai, M.A., Jones, S.W., Papoutsakis, E.T. (2014) SigmaK of *Clostridium acetobutylicum* is the first known sporulation-specific sigma factor with two developmentally separated roles, one early and one late in sporulation. *J Bacteriol* **196**, 287-299.

Al-Hinai, M.A., Jones, S.W. and Papoutsakis, E.T. (2015) The *Clostridium* Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**, 19-37.

Bagyan, I., Setlow, B., and Setlow, P. (1998) New small, acid-soluble proteins unique to spores of *Bacillus subtilis*: identification of the coding genes and regulation and function of two of these genes. *J Bacteriol* **180**, 6704-6712.

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

Bakken, L. and Frostegård, Å. (2006) Nucleic acid extraction from soil, pp 49-73. Book chapter in Series on Soil Biology Volume 8 (350 p), "Nucleic Acids and Proteins in Soil". Eds. K. Smalla and P. Nannipieri. Springer-Verlag, Berlin.

Bassi, D., Cappa, F., and Cocconcelli, P.S. (2013) Array-based transcriptional analysis of *Clostridium sporogenes* UC9000 during germination, cell outgrowth and vegetative life. *Food Microbiol* **33**, 11-23.

Battistuzzi, F.U., Feijao, A., and Hedges, S.B. (2004) A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol* **4**, 44.

Bertram, J. (1989) Entwicklung eines Systems zum DNA-Transfer und zur Transposon-Mutagenese für *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.

Bradford, M. (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Brandts, J.F. (1967) Heat effects on proteins and enzymes. In: Rose AH, editor. Thermobiology. London, UK: Academic Press. p 27-72.

Breznak, J.A., and Costilow, R.N. (1994) Physicochemical factors in growth. In: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg (Herausgeber.), Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.

Bricker, T., and Frankel, L. (1998) The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of Photosystem II: a critical assessment. *Photosynth Res* **56**, 157-173.

Burns, D.A., Heap, J.T., and Minton N.P. (2010) "The diverse sporulation characteristics of *Clostridium difficile* clinical isolates are not associated with type." *Anaerobe* **16**, 618-622.

Cabrera-Hernandez, A., Sanchez-Salas, J.L., Paidhungat, M., and Setlow, P. (1999) Regulation of four genes encoding *small, acid-soluble spore proteins* in *Bacillus subtilis*. *Gene* **232**, 1-10.

Cabrera-Hernandez A., and Setlow, P. (2000) Analysis of the regulation and function of five genes encoding *small, acid-soluble spore proteins* of *Bacillus subtilis*. *Gene* **248**, 169-181.

Cabrera-Martinez, R.M., Mason, J.M., Setlow, B., Waites, W.M., and Setlow, P. (1989) Purification and amino acid sequence of two *small, acid-soluble proteins* from *Clostridium bifermentans* spores. *FEMS Microbiol Lett* **52**, 139-143.

Carrillo-Martinez, Y., and Setlow, P. (1994) Properties of *Bacillus subtilis* small, acid-soluble spore proteins with changes in the sequence recognized by their specific protease. *J Bacteriol* **176**, 5357-5363.

Carroll, T.M., and Setlow, P. (2005) Site-directed mutagenesis and structural studies suggest that the germination protease, GPR, in spores of *Bacillus* species is an atypical aspartic acid protease. *J Bacteriol* **187**, 7119-7125.

Carroll, T.M., (2008) Germination protease: An atypical aspartic acid protease in *Bacillus* and *Clostridium*. Dissertation. University of Connecticut.

Chalmers, J.J., Kim, E., Telford, J.N., Wong, E.Y., Tacon, W.C., Shuler, M.L., and Wilson, D.B. (1990) Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing β -lactamase or human epidermal growth factor. *Appl Environ Micro* **56**, 104-111.

Checinska, A., Burbank, M., and Paszczynski, A.J. (2012) Protection of *Bacillus pumilus* spores by catalases. *Appl Environ Microbiol* **78**, 6413-6422.

Colas de la Noue, A., Peters, J., Gervais, P., Martinez, N., Perrier-Cornet, J.M., and Natali, F. (2015) Proton dynamics in bacterial spores, a neutron scattering investigation. *EPJ Web of Conferences* **83**, 02003.

Connors, M.J., Mason, J.M., and Setlow, P. (1986) Cloning and nucleotide sequencing of genes for three *small, acid-soluble proteins* from *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **166**, 417-425.

Craig, L.C. (1967) Techniques for the Study of Peptides and Proteins by Dialysis and Diffusion. *Methods Enzymol* **11**, 870-905.

Cucchi, A, and Sanchez de Rivas, C. (1998) SASP (*small, acid-soluble spore proteins*) and spore properties in *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Curr Microbiol* **36**, 220-225.

Cummings, L., Riley, K., Black, L., Souvorov, A., Resenchuk, S., Dondoshansky, I., and Tatusova, T. (2002) Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes. *FEMS Microbiol Lett* **216**, 133-138.

- Dembek, M., Stabler, R.A., Witney, A.A., Wren, B.W., and Fairweather, N.F. (2013)** Transcriptional analysis of temporal gene expression in germinating *Clostridium difficile* 630 endospores. *PLoS One* **8**, e64011.
- Dignam, S.S., and Setlow, P. (1980)** *Bacillus megaterium* spore protease. Action of the enzyme on peptides containing the amino acid sequence cleaved by the enzyme *in vivo*. *J Biol Chem* **255**, 8408-8412.
- Dittmann, C., Han, H.M., Grabenbauer, M., and Laue, M. (2015)** Dormant *Bacillus* spores protect their DNA in crystalline nucleoids against environmental stress. *J Struct Biol* doi: 10.1016/j.jsb.2015.06.019.
- Dixit, A., Alam, S.I., Dhaked, R.K., and Singh, L. (2006)** Sporulation and Heat Resistance of Spores from a *Clostridium* sp. RKD. *J Food Science* **70**, 367-373.
- Douki, T., Setlow, B., and Setlow, P. (2005)** Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species. *Photochem Photobiol Sci* **4**, 893-896.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res* **16**, 6127-6145.
- Driks, A. (2002)** Proteins of the spore core and coat. In *Bacillus subtilis and its Closest Relatives: from Genes to Cells*. pp. 527-535. Edited by Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Dürre P. (2005)** Sporulation in clostridia (genetics). In Handbook on clostridia. pp. 659-669. Edited by Dürre, P., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dürre, P. (2011)** Fermentative production of butanol - the academic perspective. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 1-6.
- Dürre, P. (2011)** Ancestral sporulation initiation. *Mol Microbiol* **80**, 584-587.
- Dürre, P. (2014)** Physiology and Sporulation in *Clostridium*. *Microbiol Spectrum* **2**, TBS-0010-2012.
- Dürre, P., and Hollergrschwandner, C. (2004)** Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Anaerobe* **10**, 69-74.
- Élő, P., Farkas, S.L., Dán, A.L., and Kovács, G.M. (2003)** The p32K structural protein of the atadenovirus might have bacterial relatives. *J Mol Evol* **56**, 175-180.
- Errington, J. (2003)** Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Rev Microbiol* **1**, 117-126.
- Errington, J. (1993)** *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Revs* **57**, 1-33
- Fairhead, H., Setlow, B. and Setlow, P. (1993)** Prevention of DNA damage inspores and *in vitro* by small, acid-soluble proteins from *Bacillus* species. *J Bacteriol* **175**, 1367-1374.

- Fajardo-Cavazos, P., Tovar-Rojo, F., and Setlow, P. (1991)** Effect of promoter mutations and upstream deletions on the expression of genes coding for small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**, 2011-2016.
- Feller, G. (2013)** Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica*: Article ID 512840.
- Fischer, R.J., Oehmcke, S., Meyer, U., Mix, M., Schwarz, K., Fiedler, T., and Bahl, H. (2006)** Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J Bacteriol* **188**, 5469-5478.
- Francesconi, S.C., MacAlister, T.J., Setlow, B., and Setlow, P. (1988)** Immunoelectron microscopic localization of *small, acid-soluble spore proteins* in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **170**, 5963-5967.
- Galperin, M.Y., Mekhedov, S.L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y.I., and Rigden, D.J. (2012)** Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environ Microbiol* **11**, 2870-2890.
- Ge, Y., Wu, J., Xiao, J., and Yu, J. (2011)** Exploration of the binding mode of α/β -type *small acid soluble proteins* (SASPs) with DNA. *J Mol Model* **17**, 3183-3193.
- Ghim, S.Y., Choi, S.K., Shin, B.S, and Park, S.H. (1998)** An 8 kb nucleotide sequence at the 3' flanking region of the *sspC* gene (184 degrees) on the *Bacillus subtilis* 168 chromosome containing an intein and an intron. *DNA Res* **5**, 121-126.
- Girbal, L., von Abendroth, G., Winkler, M., Benton, P.M., Meynil-Salles, I., Croux, C., Peters, J.W., et al. (2005)** Homologous and heterologous over-expression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2777-2781.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylationrestriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4645-4649.
- Gründlich, B. (2015)** Hitzeresistenz von Sporen mit SASP-Defekten bei *Clostridium acetobutylicum*. Bachelorarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock
- Hackett, R.H., and Setlow, P. (1983)** Enzymatic activity of precursors of *Bacillus megaterium* spore protease. *J Bacteriol* **153**, 375-378.
- Hackett, R.H., and Setlow, P. (1988)** Properties of spores of *Bacillus subtilis* strains which lack the major *small, acid-soluble protein*. *J Bacteriol* **170**, 1403-1404.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harwood, C.R., and Cutting, S.M. (1990)** "Molecular biological methods for *Bacillus*." John Wiley & Sons Ltd, New York, S. 62; 417

Hayes, C.S., Alarcon-Hernandez, E., and Setlow, P. (2001) N-terminal amino acid residues mediate protein-protein interactions between DNA-bound α/β -type small, acid-soluble spore proteins from *Bacillus* species. *J Biol Chem* **276**, 2267-2275.

Hayes, C.S., and Setlow, P. (2001) An α/β -type, small, acid-soluble spore protein which has very high affinity for DNA prevents outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **183**, 2662-2666.

Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T., Carter, G.P., and Minton, N.P. (2007) The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Meth* **70**, 452-464.

Heap, J.T., Kuehne, S.A., Ehsaan, M., Cartman, S.T., Cooksley, C.M., Scott, J.C., and Minton, N.P. (2010) The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J Microbiol Methods* **80**, 49-55.

Henriques, A.O. and Moran, C.P.Jr. (2007) Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Ann Rev Microbiol* **61**, 555-588.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.

Holmgren, A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* **3**, 239-243.

Illades-Aguiar, B., and Setlow, P. (1994) Studies of the protease which initiates degradation of small, acid-soluble proteins during germination of spores of *Bacillus* species. *J Bacteriol* **176**, 2788-2795.

Janssen, H. (2010) Das Proteom und Transkriptom von *Clostridium acetobutylicum* bei unterschiedlichen pH-Werten im Chemostaten. Dissertation. Universität Rostock.

Janssen, H., Grimmier, C., Ehrenreich, A., Bahl, H., and Fischer, R.J. (2012) A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of *Clostridium acetobutylicum* – solvent stress caused by a transient n-butanol pulse. *J Biotechnol* **161**, 354-365.

Jenzen, F. (2015) Mutagenese von ‘Thioredoxin-like proteins’ (TLP) aus *Bacillus subtilis* und *Clostridium acetobutylicum*. Masterarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock.

Johnson, K.M. and Busta, F.F. (1984) Heat-induced temperature sensitivity of outgrowing *Bacillus cereus* spores. *Appl Environ Microbiol* **47**, 768-774.

Johnson, W.C., and Tipper, D.J. (1981) Acid-soluble spore proteins of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **146**, 972-982.

Jones, S.W. (2011) Elucidating the transcriptional regulation of sporulation in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Northwestern University, Evanston, IL.

Jones, S.W., Paredes, C.J., Tracy, B., Cheng, N., Sillers, R., Senger, R.S., and Papoutsakis, E.T. (2008) The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biol* **9**, R114.

Keijser, B.J., Ter Beek, A., Rauwerda, H., Schuren, F., Montijn, R., van der Spek, H., and Brul, S. (2007) Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *J Bacteriol* **189**, 3624-3634.

Kozlowski, L.P. (2007-2013) Isoelectric Point Calculator. <http://isoelectric.ovh.org>

Knee, K.M., Dixit, S.B., Aitken, C.E., Ponomarev, S., Beveridge, D.L., and Mukerji, I. (2008) Spectroscopic and molecular dynamics evidence for a sequential mechanism for the A-to-B transition in DNA. *Biophys J* **95**, 257-272.

Knippers, R. (2006) Kap.4, pp. 49-86, Molekulare Genetik, 9., überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart.

Kong, L.B., Setlow, P., and Li, Y.Q (2012) Analysis of the Raman spectra of Ca²⁺-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. *Analyst* **137**, 3683.

Kosman, J., and Setlow, P. (2003) Effects of carboxy-terminal modifications and pH on binding of a *Bacillus subtilis* small, acid-soluble spore protein to DNA. *J Bacteriol* **185**, 6095-6103.

Krämer, J. (2002) Lebensmittelmikrobiologie. 4. Aufl. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer – ISBN 3-8252-1421-4.

Lazarevic, V., Dusterhoff, A., Soldo, B., Hilbert, H., Mael, C., and Karamata, D. (1999) Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SPbetac2. *Microbiol* **145**, 1055-1067.

Lee, K.S., Bumbaca, D., Kosman, J., Setlow, P., and Jedrzejas, M.J. (2008) Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 2806-2811.

Lehmann, D. (2012) Neue Einblicke in den Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.

Lehmann, M. (2013) “Funktionsanalyse des Proteins Cac1487 von *Clostridium acetobutylicum*.” Masterarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock.

Leuschner, R.G.K., and Lillford, P.J. (1999) Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* **29**, 228-232.

Leventhal, J.M., and Chambliss, G.H. (1982) Synthesis of acid-soluble spore proteins by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **152**, 1117-1125.

Leyva-Illades, J.F., Setlow, B., Sarker, M.R. and Setlow, P. (2007) Effect of a small, acid-soluble spore protein from *Clostridium perfringens* on the resistance properties of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **189**, 7927-7931.

Li, J., and McClane, B.A. (2008) A novel small acid soluble protein variant is important for spore resistance of most *Clostridium perfringens* food poisoning isolates. *PLoS Pathogens* **4**, e1000056.

- Li, J., Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R., and McClane, B.A. (2009)** Further Characterization of *Clostridium perfringens* Small Acid Soluble Protein-4 (Ssp4) Properties and Expression. *Plos One* **7**, e6249.
- Lindsay, J.A. and Murrell, W.G. (1986)** Solution spectroscopy of dipicolinic acid interaction with nucleic acids: role in spore heat resistance. *Curr Microbiol* **13**, 255-259.
- Loshon, C.A., Swerdlow, B.M., and Setlow, P. (1982)** *Bacillus megaterium* spore protease. Synthesis and processing of precursor forms during sporulation and germination. *J Biol Chem* **257**, 10838-10845.
- Loshon, C.A., Wahome, P.G., Maciejewski, M.W., and Setlow, P. (2006)** Levels of glycine betaine in growing cells and spores of *Bacillus* species and lack of effect of glycine betaine on dormant spore resistance. *J Bacteriol* **188**, 3153-3158.
- Lunze, A. (2014a)** Protokoll zur Gewinnung und Untersuchung von drei hypothetischen Proteinen aus *Clostridium acetobutylicum*. Forschungspraktikums, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock.
- Lunze, A. (2014b)** Charakterisierung von Germinationsproteasen aus *Clostridium acetobutylicum*. Masterarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock.
- Lütke-Eversloh, T., and Bahl, H. (2011)** Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr Opin Microbiol* **22**, 634-647.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker J. (2010)** "Brock: biology of microorganisms." 13. Aufl., Prentice Hall, Inc., New Jersey. 69-73; 226-227
- Mason, J.M., and Setlow, P. (1986)** Evidence for an essential role for *small, acid-soluble, spore proteins* in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to ultraviolet light. *J Bacteriol* **167**, 174-178.
- Mason, J.M., and Setlow, P. (1987)** Different *small, acid-soluble proteins* of the α/β type have interchangeable roles in the heat and ultraviolet irradiation resistance of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **169**, 3633-3637.
- Mason, J.M., Fajardo-Cavazos, P., and Setlow, P. (1988a)** Levels of mRNAs which code for *small, acid-soluble spore proteins* and their lacZ gene fusions in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **16**, 6567-6583.
- Mason, J.M., Hackett, R.H., and Setlow, P. (1988b)** Studies on the regulation of expression of genes coding for *small, acid-soluble proteins* of *Bacillus subtilis* spores using lacZ gene fusions. *J Bacteriol* **170**, 239-244.
- Mauchline, T.H., Mohan, S., Davies, K.G., Schaff, J.E., Opperman, C.H., Kerry, B.R., and Hirsch, P.R. (2010)** A method for the release and multistrand amplification of small quantities of DNA from endospores of the fastidious bacterium *Pasteuria penetrans*. *Lett Appl Microbiol* **50**, 515-521.

Mazzola P.G., Penna T.C.V., and Martins A.M. (2003) "Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes." *BMC Infect Dis* 3.

McKenney, P.T., Driks, A. and Eichenberger, P. (2013) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* **11**, 33-44.

Meaney, C.A., Cartman, S.T., McClure, P.J., Minton, N.P. (2015) The role of *small acid-soluble proteins* (SASPs) in protection of spores of *Clostridium botulinum* against nitrous acid. *Int J of Food Microbiol.* doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.024

Mermelstein, LD, and Papoutsakis, E.T. (1993) *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage ϕ 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1077-1081.

Mermelstein, L.D., Welker, N.E., Bennett, G.N., and Papoutsakis, E.T. (1992) Expression of Cloned Homologous Fermentative Genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technol* **10**, 190-195.

Millat, T, Janssen, H., Bahl, H., Fischer, R.J., and Wolkenhauer, O. (2013) Integrative modelling of pH-dependent enzyme activity and transcriptomic regulation of the acetone–butanol–ethanol fermentation of *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Micobiol Biotechnol* doi: 10.1111/1751-7915.12033.

Moeller, R., Setlow, P., Horneck, G., Berger, T., Reitz, G., Rettberg, P., Doherty, A.J., Okayasu, R. and Nicholson, W.L. (2008) Roles of the major, *small, acid-soluble spore proteins* and spore-specific and universal DNA repair mechanisms in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ionizing radiation from X-rays and high-energy charged-particle bombardment. *J Bacteriol* **190**, 1134-1140.

Monot, F., Martin, J.R., Petitdemange, H., and Gay, R. (1982) Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl Environ Microbiol* **44**, 1318-1324.

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. and Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 548-572.

Nicholson, W.L., and Setlow, P. (1990) Sporulation, germination and outgrowth, p 391–450. In Harwood CR, Cutting SM (ed), Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.

Nicholson, W.L., Sun, D., Setlow, B., and Setlow, P. (1989) Promoter specificity of σG containing RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*: Identification of a group of forespore-specific promoters. *J Bacteriol* **171**, 2708-2718.

Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M.V., Makarova, K.S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H.M., Dubois, J., Qiu, D. and other authors (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **183**, 4823-4838.

- Oelmüller, U., Krüger, N., Steinbüchel, A., and Friedrich, C. (1990)** Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J Microbiol Meth* **11**, 73-81.
- Ogram, A., Sayler, G., and Barkay, T. (1987)** The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Meth* **7**, 57-66.
- Orsburn, B.C., Melville, S.B., and Popham, D.L. (2010)** EtFA catalyses the formation of dipicolinic acid in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol* **75**, 178-186.
- Paidhungat, M., and Setlow, P. (2000)** Role of ger proteins in nutrient and nonnutritive triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**, 2513-2519.
- Pandey , R., Ter Beek, A., Vischer, N.O.E., Smelt, J.P.P.M., Brul, S. and Manders, E.M.M. (2013).** Live cell imaging of germination and outgrowth of individual *Bacillus subtilis* spores; the effect of heat stress quantitatively analyzed with SporeTracker. *PLoS One* **8**, e58972.
- Paredes, C.J., Rigoutsos, I. and Papoutsakis, E.T. (2004)** Transcriptional organization of the *Clostridium acetobutylicum* genome. *Nucleic Acids Res* **32**, 1973-1981.
- Paredes C.J., Alsaker K.V., Papoutsakis E.T., Alsaker K.V., Papoutsakis E.T., and Papoutsakis E.T (2005)** A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat Rev Microbiol* **3**, 969-978.
- Paredes-Sabja, D. (2009)** Molecular Mechanism of Germination of *Clostridium perfringens* Spores. Dissertation. Oregon State University.
- Pedersen, L.B., Nessi, C., and Setlow, P. (1997)** Most of the propeptide is dispensable for the stability and autoprocessing of the zymogen of the germination protease of spores of *Bacillus* species. *J Bacteriol* **179**, 1824-1827.
- Pei, J., and Grishin, N.V. (2002)** Breaking the singleton of germination protease. *Protein Sci* **11**, 691-697.
- Ponnuraj, K., Rowland, S., Nessi, C., Setlow, P., and Jedrzejas, M.J. (2000)** Crystal structure of a novel germination protease from spores of *Bacillus megaterium*: structural arrangement and zymogen activation. *J Mol Biol* **300**, 1-10.
- Popham, D.L.(2002)** Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox. *Cell Mol Life Sci* **59**, 426-433.
- Postemsky, C.J., Dignam, S.S., and Setlow, P. (1978)** Isolation and characterization of *Bacillus megaterium* mutants containing decreased levels of spore protease. *J Bacteriol* **135**, 841-850.
- Potratz, M. (2015)** *C. acetobutylicum*- Hitzeresistenz von Sporen mit SASP-Defekten. Bachelorarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock
- Qi, Y., and Grishin, N.V. (2005)** Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins* **58**, 376-388.

- Raju, D., Waters, M., Setlow, P., and Sarker, M.R. (2006)** Investigating the role of *small, acid-soluble spore proteins* (SASPs) in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to heat. *BMC Microbiol* **6**, 50.
- Raju, D., Setlow, P., and Sarker, M.R. (2007)** Antisense RNA-mediated decreased synthesis of *small, acid-soluble spore proteins* leads to decreased resistance of *Clostridium perfringens* spores to moist heat and UV radiation. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2048-2053.
- Reineke, K. (2013)** Mechanisms of *Bacillus* spore germination and inactivation during high pressure processing. Dissertation. Technischen Universität Berlin.
- Riebe, O. (2009)** Enzyme und Reaktionswege zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.
- Rieger, T. (2006)** "Sporulation und Glykogensynthese in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Rostock
- Riesenman, P.J., and Nicholson, W.L. (2000)** Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl Environ Microbiol* **66**, 620-626.
- Ruzal, S.M., Alice, A.F. and Sanchez-Rivas, C. (1994)** Osmoresistance of spores from *Bacillus subtilis* and the effect of *ssp* mutations. *Microbiol* **140**, 2173-2177.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001)** Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanchez-Salas, J.L., Santiago-Lara, M.L., Setlow, B., Sussman, M.D., and Setlow, P. (1992)** Properties of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* mutants which lack the protease that degrades *small, acid-soluble proteins* during spore germination. *J Bacteriol* **174**, 807-814.
- Sanchez-Salas, J.L., and Setlow, P. (1993)** Proteolytic processing of the protease which initiates degradation of *small, acid-soluble proteins* during germination of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* **175**, 2568-2577.
- Santangelo, J.D., Kuhn, A., Treuner-Lange, A., and Dürre, P. (1998)** Sporulation and time course expression of σ -factor homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 157-164.
- Schichnes, D., Nemson, J.A., and Ruzin, S.E. (2006)** Fluorescent staining method for bacterial endospores. *Microscope London Then Chicago* **54**, 91.
- Schlegel, H.G. (1992)** Allgemeine Mikrobiologie: Thieme Verlag. Stuttgart. 7. Auflage.
- Schulz, F. (2013)** Fluoreszenzproteine in *Clostridium acetobutylicum* - Ein neues *in vivo* Reportersystem. Dissertation. Universität Rostock.
- Segev, E., Smith, Y., and Ben-Yehuda, S. (2012)** RNA dynamics in aging bacterial spores. *Cell* **148**, 139-149.

- Segev, E., Rosenberg, A., Mamou, G., Sinai, L., and Ben-Yehuda, S. (2013)** Molecular kinetics of reviving bacterial spores. *J Bacteriol* **195**, 1875-1882.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., and Setlow, P. (2006)** Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type *small acid-soluble proteins*. *J Bacteriol* **188**, 3740-3747.
- Setlow, B., Hand A.R., and Setlow, P. (1991)** Synthesis of a *Bacillus subtilis small,acid-soluble spore protein* in *Escherichia coli* causes cell DNA to assume some characteristics of spore DNA. *J Bacteriol* **173**, 1642-1653.
- Setlow, B., Sun, D., and Setlow, P. (1992)** Interaction between DNA and alpha/beta-type *small, acid-soluble spore proteins*: a new class of DNA-binding protein. *J Bacteriol* **174**, 2312-2322.
- Setlow, B., Tautvydas, K.J. and Setlow, P. (1998)** *Small, acid-soluble spore proteins* of the a/b-type do not protect the DNA in *Bacillus subtilis* spores against base alkylation. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1958-1962.
- Setlow, P. (1975a)** Identification and localization of the major proteins degraded during germination of *Bacillus megaterium* spores. *J Biol Chem* **250**, 8159-8167.
- Setlow, P. (1975b)** Purification and properties of some unique low molecular weight basic proteins degraded during germination of *Bacillus megaterium* spores. *J Biol Chem* **250**, 8168-8173.
- Setlow, P. (1976)** Purification and properties of a specific proteolytic enzyme present in spores of *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* **251**, 7853-7862.
- Setlow, P. (1978)** Purification and characterization of additional low-molecular-weight basic proteins degraded during germination of *Bacillus megaterium* spores. *J Bacteriol* **136**, 331-340.
- Setlow, P. (1988)** *Small acid-soluble, spore proteins* of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function and degradation. *Annu Rev Microbiol* **42**, 319-338.
- Setlow, P. (1992)** I will survive: protecting and repairing spore DNA. *J Bacteriol* **174**, 2737-2741.
- Setlow, P. (1995)** Mechanisms for the prevention of damage to the DNA in spores of *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* **49**, 29-54.
- Setlow, P. (2003)** Spore germination. *Curr Opin Microbiol* **6**, 550-556.
- Setlow, P. (2006)** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* **101**, 514-525.
- Setlow, P. (2007)** I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol* **15**, 172-180.
- Setlow, P. (2013)** Summer meeting 201-when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *J Appl Microbiol* **115**, 1251-1268.

- Setlow, P., Gerard, C., and Ozols, J. (1980)** The amino acid sequence specificity of a protease from spores of *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* **255**, 3624-3628.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D. and other authors (2011)** Fast, scalable generation of highquality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539.
- Silver, S., Chandra, T., Zilinskas, E., Ghose, S., Broderick, W., and Broderick, J. (2010)** Complete stereospecific repair of a synthetic dinucleotide spore photoproduct by spore photoproduct lyase. *J Biol Inorg Chem* **15**, 943-955.
- Sinai, L., Rosenberg, A., Smith, Y., Segev, E., and Ben-Yehuda, S. (2015)** The molecular timeline of a reviving bacterial spore. *Mol Cell* **57**, 695-707.
- Southern, E.M. (1975)** Detection of specific sequences among fragments separated by gelelectrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Stecker, D. (2012)** "Funktionelle Analyse von Sporenproteinen aus *Clostridium acetobutylicum*." Masterarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock.
- Steil, L., Serrano, M., Henriques, A.O., and Völker, U. (2005)** Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiol* **151**, 399-420.
- Stephens, M.A., Lang, N., Sandman, K.L., and Losick, R. (1984)** A promoter whose utilization is temporally regulated during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **176**, 333-348.
- Stragier, P., and Losick, R. (1996)** Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **30**, 297-341.
- Struvay, C., and Feller, G. (2012)** Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *Int J Mol Sci* **13**, 11643-11665.
- Sunde, E.P., Setlow, P., Hederstedt, L., and Halle, B. (2009)** The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 19334-19339.
- Sussman, M.D., and Setlow, P. (1991)** Cloning, nucleotide sequence, and regulation of the *Bacillus subtilis* *gpr* gene which codes for the protease that initiates degradation of small, acid-soluble proteins during spore germination. *J Bacteriol* **173**, 293-300.
- Tavares, M.B., Souza, R.D., Luiz, W.B., Cavalcante, R.C.M., Casaroli, C., Martins, E.G., Ferreria, R.C.C., and Ferreria, L.C.S. (2013)** *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: Optimization of growth conditions and purification method. *Curr Microbiol* **66**, 279-285.
- Tomas, C., Alsaker, K., Bonarius, H., Hendriksen, W., Yang, H., Beamish, J., Paredes, C. and Papoutsakis, E. (2003)** DNA array-based transcriptional analysis of asporogenous, nonsolventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains SKO1 and M5. *J Bacteriol* **185**, 4539-4547.

- Torok, T. (2003)** Extraction of PCR amplifiable genomic DNA from *Bacillus anthracis* spores. *Sci Tech Connect* 1-26.
- Tovar-Rojo, F., Cabrera-Martinez, R.M., Setlow, B., and Setlow, P. (2003)** Studies on the mechanism of the osmoresistance of spores of *Bacillus subtilis*. *J Appl Microbiol* **95**, 167-179.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- Traag, B.A., Pugliese, A., Setlow, B., Setlow, P., and Losick, R. (2013)** A conserved ClpP-like protease involved in spore outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **90**, 10.1111/mmi.12355.
- Tracy, B.P., Jones, S.W., and Papoutsakis, E.T. (2011)** Inactivation of σ^E and σ^G in *Clostridium acetobutylicum* illuminates their roles in clostridial-cell-form biogenesis, granulose synthesis, solventogenesis, and spore morphogenesis. *J Bacteriol* **193**, 1414-1426.
- Vajpai, N., Nisius, L., Wiktor, M. and Grzesiek, S. (2013)** High-pressure NMR reveals close similarity between cold and alcohol protein denaturation in ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, E368-E376.
- Vandeventer, P.E., Weigel, K.M., Salazar, J., Erwin, B., Irvine, B., Doebler, R. et al. (2011)** Mechanical disruption of lysis-resistant bacterial cells by use of a miniature, low-power, disposable device. *J Clin Microbiol* **49**, 2533-2539.
- Vary, J.C. and Halvorson, H.O. (1968)** Initiation of bacterial spore germination. *J Bact* **95**, 1327.
- Vocero-Villeta, A.M., Schilling, D.M., and Fliss, E.R. (1991)** Nonsporulating bacterial species contain DNA sequences homologous to the *Bacillus* spore-specific C-proteins gene. *Genomics* **9**, 290-297.
- Voigt, C. (2014)** Die Bedeutung des *fru*-Operons für die Aufnahme von Fruktose in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.
- Vyas, J., Cox, J., Setlow, B., Coleman, W.H., and Setlow, P. (2011)** Extremely variable conservation of gamma-type small, acid-soluble proteins from spores of some species in the bacterial order Bacillales. *J Bacteriol* **193**, 1884-1892.
- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., and Eichenberger, P. (2006)** The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **358**, 16-37.
- Waterman, J.T., Bird, D.M. and Opperman, C.H. (2006)** A method for isolation of *Pasteuria penetrans* endospores for bioassay and genomic studies. *J Nematol* **38**, 165-167.
- Wetzel, D. (2012)** "Small acid-soluble spore proteins - Defektmutanten in *Clostridium acetobutylicum*." Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Rostock

Wetzel, D. and Fischer, R.J. (2015) Small acid-soluble spore proteins of *Clostridium acetobutylicum* are able to protect DNA *in vitro* and are specifically cleaved by germination protease GPR and spore protease YyaC. 10 Sept, 2015 *Microbiology* doi: 10.1099/mic.0.000162

Wiegand, K. and Hilpert, R.E. (2008) Hancock Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances *Nat Protoc* **3**, 163-175.

Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B., and Papoutsakis, E.T. (1988) Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2717-2722.

Wietzke, M., and Bahl, H. (2012) The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**, 749-761.

Xiao, Y., Francke, C., Abbe, T., and Wells-Bennik, M.H. (2011) Clostridial spore germination *versus* bacilli: genome mining and current insights. *Food Microbiol* **28**, 266-274.

Yuan, K., Johnson, W.C., Tipper, D.J., and Setlow, P. (1981) Comparison of various properties of low molecular-weight proteins from dormant spores of several *Bacillus* species. *J Bacteriol* **146**, 965-971.

Young, S.B., and Setlow, P. (2003) Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *J Appl Microbiol* **95**, 54-67.

Zhang, P.F., Setlow, P., and Li, Y.Q. (2009) Characterization of single heat-activated *Bacillus* spores using laser tweezers Raman spectroscopy. *Opt Express* **17**, 16480-16491.

Zimmermann, K. (2011) "Charakterisierung einer *glgA*-Integrationsmutante *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Rostock.

7 Anhang

Tab 7.1: Oligonukleotide

Primername	5'-3' Sequenz ¹	Verwendung
EBS Universal	CGAAATTAGAAACTTGCCTTCAGTAAC	Intron-spezifischer Primer ClosTron
IBS_sspH_53s	AAAAAAAGCTTATAATTATCCTTAATACACGTTAAGGT GCGCCCAGATAGGGTG	<i>sspH</i> -spezifischer Primer ClosTron
EBS1d_sspH_53s	CAGATTGTACAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGT TAAGTCTAACCTACCTTCTTGT	<i>sspH</i> -spezifischer Primer ClosTron
EBS2_sspH_53s	TGAACGCAAGTTCTAATTTCGGTTGTATCCGATAG AGGAAAGTGTCT	<i>sspH</i> -spezifischer Primer ClosTron
cac2365 fw	ATGTCAAGAAGAAATAACC	sqRT-PCR
cac2365 rev	CTATTAAAGGCTGCTTC	sqRT-PCR
cac2372 fw	ATGGGGAAAACACCGC	sqRT-PCR
cac2372 rev	TCAATTATAATTATTGGAGTTT	sqRT-PCR
cac1522 fw	ATGAGTAGACGTCCATT	sqRT-PCR
cac1522 rev	TTATTATCAGACATCTTTT	sqRT-PCR
cac1620 fw	GTGGCAAATTATAATAAAAAG	sqRT-PCR
cac1620 rev	CTATTCTATTATCCTCGT	sqRT-PCR
cac1663 fw	TTGGATAGAGAAAGAGTG	sqRT-PCR
cac1663 rev	CTACTCCTTTAAGTCTTTA	sqRT-PCR
cac1487 fw	ATGAAGAGTAAACCAGATGA	sqRT-PCR
cac1487 rev	TTATTGTATCCTTTCTTAG	sqRT-PCR
Eub 1	GAGTTGATCCTGGCTAG	sqRT-PCR-16S
Eub 2	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	sqRT-PCR-16S
pT fw	GGGATAAACTATGGAACTTATGAAA	Sequenzierung
pT rev	TGCAAGAACATGTGAGAGCTAGAAA	Sequenzierung
cac2365 S1	CTATTAAAGGCTGCTTCATATTCT	5'-RACE
cac2365 S2	TACAGATCCATTCTCTTG	5'-RACE
cac2372 S1	TCAATTATAATTATTGGAGTTT	5'-RACE
cac2372 S2	ATCCATAATTATCGACTTTG	5'-RACE
cac1487 S1	CTTTTCTTTAGCCCTAGCTTCATC	5'-RACE
cac1487 S2	TTTTAGCCTTAAATCGCT	5'-RACE
cac2365 fw <i>Bam</i> HI	aaaaaaGGATCCATGTCAAGAAGAAATAACCA	Überexpression
cac2365 rev <i>Cfr</i> 9I	aaaaaaCCCGGGTTAACGGCTGCTTCATATT	Überexpression
cac2372 fw <i>Bam</i> HI	aaaaaaGGATCCATGGGGAAAACACCGC	Überexpression
cac2372 rev <i>Cfr</i> 9I	aaaaaaCCCGGGATTATAATTATTGGAGTTTTAG	Überexpression
cac1522 fw <i>Bam</i> HI	aaaaaaGGATCCATGAGTAGACGTCCATT	Überexpression
cac1522 rev <i>Cfr</i> 9I	aaaaaaCCCGGGTTATCAGACATCTTTTTC	Überexpression
cac1620 fw <i>Bam</i> HI	aaaaaaGGATCCGTGGCAAATTATAATAAAAAG	Überexpression
cac1620 rev <i>Cfr</i> 9I	aaaaaaCCCGGGTTCTATTATCCTCGTAG	Überexpression
cac1663 fw <i>Bam</i> HI	aaaaaaGGATCCATTGGATAGAGAAAGAGTG	Überexpression
cac1663 rev <i>Cfr</i> 9I	aaaaaaCCCGGGCTCCTTAAGTCTTAATGT	Überexpression
cac1487 fw <i>Bam</i> HI	aaaaaaGGATCCATGAAGAGTAAACCAGATG	Überexpression
cac1275 fw <i>Bam</i> HI	aaaaaaGGATCCATGAATAGTGGTAGAACTGA	Überexpression
cac1275 rev <i>Cfr</i> 9I	aaaaaaCCCGGGATTAAACATAATTATTTATTCAC	Überexpression
cac2857 fw <i>Bam</i> HI	aaaaaaGGATCCATTGAACAAAATCAAAGCTTT	Überexpression
cac2857 rev <i>Cfr</i> 9I	aaaaaaCCCGGGTTTAGTGTAGATGCGCTA	Überexpression
PsspA fw <i>Pst</i> I	aaaaactGCAGTAATATACTCCAAAGCTT	Komplementation
PsspA rev <i>Bam</i> HI	aaaaaGGATCCAATCAACTACCTCCTTAAA	Komplementation
PsspB fw <i>Pst</i> I	aaaaactGCAGTTGTATCTATTCTTACAGCT	Komplementation
PsspD fw <i>Pst</i> I	aaaaactGCAGTAAGACTATTGATTAAATAATC	Komplementation
PsspF fw <i>Pst</i> I	aaaaactGCAGGGCTTGGATTCCCTCCA	Komplementation
PsspF rev <i>Bam</i> HI	aaaaggatccataaatccctccaaaatAGTA	Komplementation
PsspH fw <i>Pst</i> I	aaaactGCAGAAATGAAAGGGTTAATTTCG	Komplementation
ErmRAM fw	ACCGTTATATTGATAAAAATAATAGTGGG	Southern Blot
ErmRAM rev	ACCGTGCAGACTCATAGAATTATTCCCTCCCG	Southern Blot

¹ Die in den Oligonukleotidsequenzen unterstrichenen Basen symbolisieren entsprechende Restriktionsschnittstellen

Tab. 7.2: Vektoren

Vektor	Relevantes Merkmal	Herkunft/Referenz
pMTL007C	<i>fac</i> , ClosTron- ErmRAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2-Terminator, <i>pCB102</i> , <i>catP</i> , ColE1, <i>lacI</i> , <i>oriT</i>	Heap <i>et al.</i> , 2007 Nr. 19
pMTL007C-E2	<i>Cspfdx</i> , ErmRAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2-Terminator, <i>pCB102</i> , <i>catP</i> , ColE1, <i>lacZalpha</i> , <i>oriT</i> , Cm ^R	Heap <i>et al.</i> , 2007 Nr. 20
pAN-II	Tet ^R , Φ 3 λ I; p15A oriR	Heap <i>et al.</i> , 2007 Nr. 271
pTcatP::hydA	<i>thlA</i> Promotor, <i>hydA</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Schulz, 2013 Nr. 397

Tab. 7.3: Identitäten der SASPs von *C. acetobutylicum* zueinander und zu SASPs von *B. subtilis* und *C. perfringens*

Ident	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824						<i>B. subtilis</i> 168						<i>C. perfringens</i> str. 13				
	SspA	SspB	SspD	SspF	SspH	Tlp	SspA	SspB	SspC	SspD	SspF	SspH	Tlp	Ssp1	Ssp2	Ssp3	Ssp4
SspA	100	39	45	18	0	0	40	42	39	45	31	5	0	58	56	60	24
SspB	39	100	33	21	0	0	27	29	26	29	0	0	0	43	46	45	20
SspD	45	33	100	20	0	0	28	34	28	36	0	0	0	40	41	38	21
SspF	18	21	20	100	0	0	14	14	14	15	21	0	5	23	22	22	68
SspH	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	26	10/7	0	0	0	0
Tlp	0	0	0	0	0	100	0	0	0	11	0	0	43	0	0	0	3

¹ Blast-Analysen (Cummings *et al.*, 2002)**Tab. 7.4:** MALDI-TOF MS identifizierte Proteine des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* (siehe Abb. 7.1). Angeben ist der Rank (bei Doppelidentifikationen) mit Wert des Bio Samples (BS), die Spotnummer, der ORF mit Proteinname, die Accession Number (www.uniprot.org), das Molekulargewicht (MW) in Kilotdalton [kDa] und der pH-Wert des isoelektrischen Punktes (pI).

Rank (BS)	Spot	ORF, Proteinname	Accession Number	MW (kDa)	pI
<i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp (A) Abb. 7.1					
1 (731)	01	Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
1 (113)	02	Cac3309, Predicted membrane protein	Q97E11 Q97E11_CLOAB	58,47	12,01
1 (08)	03	Cac2799, Uncharacterized conserved protein, similar to lppY/lpqO of <i>M. tuberculosis</i>	Q97FE1 Q97FE1_CLOAB	17,54	7,33
1 (277)	04	Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
1 (683)	05	Cac3357, hypothetical protein	Q97DW3 Q97DW3_CLOAB	15,54	9,06
1 (92)	06	Cac3357, hypothetical protein	Q97DW3 Q97DW3_CLOAB	15,54	9,06
2 (5)		Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
1 (112)	07	Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
2 (7)		Cac1663, hypo. protein (SspH)	Q97IH8 Q97IH8_CLOAB	6,69	7,19
1 (238)	08	Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
2 (2)		Cac1522, SASP (SspB)	Q97IW8 Q97IW8_CLOAB	7,24	9,32
1 (77)	09	Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
1 (162)	10	Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
2 (2)		Cac1522, SASP (SspB)	Q97IW8 Q97IW8_CLOAB	7,24	9,32
1 (10)	11	Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
1 (6)	12	Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53
1 (6)	13	Cac2799, Uncharacterized conserved protein, similar to lppY/lpqO of <i>M. tuberculosis</i>	Q97FE1 Q97FE1_CLOAB	17,54	7,33
2 (5)		Cac2365, SASP (SspA)	Q97GK1 Q97GK1_CLOAB	7,25	9,53

Fortsetzung nächste Seite

Rank (BS)	Spot	ORF, Proteinname	Accession Number	MW (kDa)	pI
1 (53)	14	Cac1363, Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Q97JC3 Q97JC3_CLOAB	19,99	8,31
2 (23)		Cac0678, CBS domains	Q97L84 Q97L84_CLOAB	15,09	5,36
<i>C. acetobutylicum sspA Mutante (B) Abb. 7.1</i>					
1 (23)	15	Cac3309, Predicted membrane protein	Q97E11 Q97E11_CLOAB	58,47	12,01
1 (5)	16	Cac3357, hypothetical protein	Q97DW3 Q97DW3_CLOAB	15,54	9,06
1 (41)	17	Cac1820, Phosphocarrier HPr	Q6XZF1 Q6XZF1_CLOAT	9,03	8,41
2 (36)		Cac2990, Cold shock protein	Q97EW6 Q97EW6_CLOAB	7,31	4,98
1 (19)	18	Cac3317, Spore coat protein F (CotF) family protein	Q97E03 Q97E03_CLOAB	10,16	4,59
1 (15)		Cac1486, Full UPF0180 protein	Q97J00 Y1486_CLOAB	9,30	5,05
1 (30)	19	Cac0807, Cold shock protein	Q97KV9 Q97KV9_CLOAB	7,10	4,94
2 (25)		Cac2595, hypothetical protein	Q97FY0 Q97FY0_CLOAB	6,77	4,80
1 (152)	20	Cac2776, hypothetical protein	Q97FG3 Q97FG3_CLOAB	31,22	5,14
1 (319)	21	Cac2728, hypothetical protein	Q97FK9 Q97FK9_CLOAB	24,67	5,20
2 (86)		Cac0678, CBS domains	Q97L84 Q97L84_CLOAB	15,09	5,36
1 (13)	22	Cac3244, Spore cortex-lytic enzyme, pre-pro-form	Q97E72 Q97E72_CLOAB	48,76	7,98
1 (252)	23	Cac2595, hypothetical protein	Q97FY0 Q97FY0_CLOAB	6,77	4,80
1 (53)	24	Cac3357, hypothetical protein	Q97DW3 Q97DW3_CLOAB	15,54	9,06
1 (16)		Cac0678, CBS domains	Q97L84 Q97L84_CLOAB	15,09	5,36
1 (18)	25	Cac3357, hypothetical protein	Q97DW3 Q97DW3_CLOAB	15,54	9,06

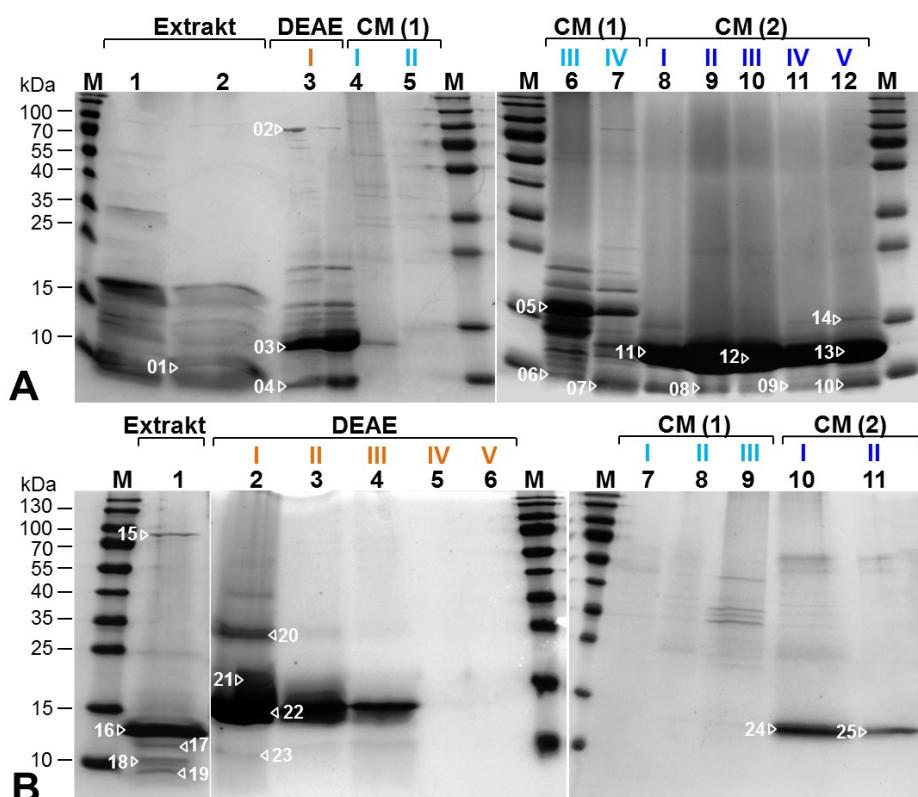


Abb. 7.1: Sporenproteine des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum*. Die Nummern markieren alle Proteinbanden, welche mittels MALDI-TOF MS identifiziert worden sind. Die identifizierten Proteine des Wildtyps und der *sspA* Mutante sind in der Tabelle 7.4 aufgelistet. (A) Aufreinigung Sporenproteine *C. acetobutylicum* Wildtyp: isoliertes Gesamtprotein (Spuren 1-2); DEAE-Säulendurchfluss (I, Spur 3); Elutionsfraktionen der CM-Säule mit 0-0,4 M NaCl (I-IV, Spuren 4-7) und mit 0,4-1 M NaCl (I-V, Spuren 8-12). (B) Aufreinigung Sporenproteine *C. acetobutylicum* *sspA* Mutante: isoliertes Gesamtprotein (Spur 1); DEAE-Säulendurchfluss (I-V, Spuren 2-6); Elutionsfraktionen der CM-Säule mit 0-0,4 M NaCl (I-III, Spuren 7-9) und mit 0,4-1 M NaCl (I-II, Spuren 10-11). M, Prestained Protein Ladder.

(A)



(B)



Abb. 7.2: Chromosomal DNA-Lokus von *sspF* (A) und *tlp* (B) in *C. acetobutylicum*. Die jeweilige ORFs sind grau hervorgehoben und die Aminosäuresequenzen im Einbuchstabencode darunter angegeben. Der Stern (*) markiert das Stopcodon. Im nicht-kodierenden Bereich befindet sich der TSP (+1) für das *sspF*-Gen 39 Bp und für das *tlp*-Gen 55 Bp stromaufwärts vom ATG-Codon, gekennzeichnet durch rechtwinklige Pfeile. Das entsprechende Nukleotid (G) ist in Großbuchstaben angegeben. Die Ribosomenbindestelle (RBS) befindet sich im Abstand von 5-7 Bp vor dem ATG. Die -35 und -10 Promotorregionen sind eingerahmt und zeigen bei *sspF* hohe Übereinstimmungen zu dem Vorsporen-spezifischen Sigma-Faktor σ^G und bei *tlp* zu dem Vorsporen-spezifischen Sigma-Faktor σ^F (σ^G/σ^F Konsensus Cac, N= A, C, G, oder T; Y= C, T; R= A, G; Dürre, 2005). Stromabwärts der Gene befinden sich weiterhin Rho-unabhängige Terminatoren, illustriert durch gestrichelte aufeinander zulaufende Pfeile.

	-35		-10	
SigG	GAATA	-17/18-	CATACTA	Vyas et al., 2011
SigG	GNATR	-18-	CATNNTA	Dürre, 2005
SigF	GYWTA	-16-	GNRANANTW	Dürre, 2005
Cac <i>sspA</i>	AATA GAATA AAATATCTTAAAAAGCA---	CAAAC TATAA	(17)	Diese Arbeit
Cac <i>sspB</i>	TTTG GTATA ATATATGTATATACAA--	AAAAC TTATAA	(18)	Diese Arbeit
Cac <i>sspD</i>	ACAT GCATA TCTTATATAAAAATAC--	AAAAC TAATAA	(17)	Diese Arbeit
Cac <i>sspF</i>	ATTAG GAATA AAAACGTTATTATGAG--	CAAAC TAGTAT	(17)	Diese Arbeit
Cac <i>sspH</i>	TTTA GCATA TATATGGATAGGAATAAA--	GATAATT TATT	(18)	Diese Arbeit
Cac <i>tlp</i>	ATATA ACATA AGATGTTAGTG--	GGAAA ATAAAAAA	(17)	Diese Arbeit
Bsu <i>sspA</i>	TTCT TGAATG AAAGCCATGTGTTTGACA--	CATT CTACTC	(17)	Nicholson et al., 1989
Bsu <i>sspB</i>	CTCC GCATG ATTTCGGGCCATTAA--	CATAA TACGTAG	(17)	Nicholson et al., 1989
Bsu <i>sspC</i>	GCGT GTATA AAATTAAATACTCTC--	CATAA TATGATT	(16)	Nicholson et al., 1989
Bsu <i>sspD</i>	GCCAG GCATA AAATAAACCCGTATATT--	CAAAC TAATAC	(17)	Nicholson et al., 1989
Bsu <i>sspF</i>	TTAACGAAAGTCCATCTGATTAA--	CAAA AGATAAAA	(16)	Stephens et al., 1984
Bsu <i>sspI</i>	CAGC ACATA ATAAACCCAGGTGCAGGGT	TAGAAT ATACG	(18)	Cabrera-Hernandez and Setlow, 2000
Bsu <i>sspI</i>	TGAT GTATT ATATCGCAAGAACAGCA--	CATAA TAACC	(18)	Cabrera-Hernandez and Setlow, 2000
Bsu <i>sspJ</i>	TCCC GCATA ATTTCAGGAAAAA--	GGCAT CTTAAACAA	(17)	Bagyan et al., 1998
Bsu <i>sspK</i>	CGCT TTATT ACGTGGTCTCATAT--	ACTAA CTTAC	(18)	Cabrera-Hernandez and Setlow, 2000
Bsu <i>sspL</i>	AAAA GAATT AAATCTGATCATTGGTT--	CATCCT ATGG	(18)	Cabrera-Hernandez et al., 1999
Bsu <i>sspM</i>	AATT GTATG ATCCTCCTCATTAATGCA--	AACGAT ACTTG	(18)	Cabrera-Hernandez and Setlow, 2000
Bsu <i>sspN/sspQ</i>	GTATT CATG TTTACCCCTCTTGTAG--	AAACCT ATCTG	(18)	Cabrera-Hernandez et al., 1999
Bsu <i>sspO/sspP</i>	TCTCT CATA AAACACAATAAAAGAAGCCA	TATTAT GATTG	(20)	Cabrera-Hernandez and Setlow, 2000

Abb. 7.3: Vorsporen-spezifische Sigma-Faktoren der *ssp*-Gene von *C. acetobutylicum* und der *ssp* Gene von *B. subtilis*. Das Sequenz-Alignment wurde mit Hilfe von Clustal Omega (Sievers et al., 2011) erstellt. Die -35 und -10 Konsensus-Sequenzen der Sigma-Faktoren SigG (*Bsu*; Vyas et al., 2011) und SigG/SigF (*Cac*; N= A, C, G, oder T; Y= C, T; R= A, G und W= A, T; Dürre, 2005) sind oberhalb der Promotorregionen angegeben. Fettgedruckte Nukleotide bedeuten 90 % Konservierung und nicht fettgedruckte Nukleotide 50-70 % Konservierung. Zahlen in Klammern geben den Abstand von Nukleotiden zwischen der -35 und -10 Promotorregion an. Cac, *C. acetobutylicum*; Bsu, *B. subtilis*.

SspA								SspB								SspD							
Ala	Phe	Val	Cys	Ser	Asp	Lys		Ala	Phe	Val	Cys	Ser	Asp	Lys		Ala	Phe	Val	Cys	Ser	Asp	Lys	
= 4	= 1	= 5	= 0	= 5	= 2	= 6		= 4	= 2	= 3	= 0	= 4	= 1	= 11		= 5	= 1	= 3	= 0	= 3	= 5	= 8	
Met	Gly	Trp	Asn	Thr	Glu	Arg		Met	Gly	Trp	Asn	Thr	Glu	Arg		Met	Gly	Trp	Asn	Thr	Glu	Arg	
= 4	= 7	= 0	= 5	= 2	= 6	= 5		= 4	= 9	= 0	= 1	= 1	= 1	= 10	= 3	= 3	= 6	= 0	= 4	= 2	= 7	= 3	
Pro	Ile	= Leu	Gln	Tyr	Sec	His		Pro	Ile	= Leu	Gln	Tyr	Sec	His		Pro	Ile	= Leu	Gln	Tyr	Sec	His	
= 1	1	= 5	= 4	= 2	= 0	= 0		= 4	3	= 5	= 0	= 1	= 0	= 0	= 0	= 1	4	= 5	= 1	= 3	= 0	= 0	
SspF								SspH								Tlp							
Ala	Phe	Val	Cys	Ser	Asp	Lys		Ala	Phe	Val	Cys	Ser	Asp	Lys		Ala	Phe	Val	Cys	Ser	Asp	Lys	
= 2	= 0	= 3	= 0	= 3	= 2	= 18		= 2	= 1	= 6	= 0	= 5	= 6	= 8		= 5	= 1	= 1	= 1	= 3	= 9	= 11	
Met	Gly	Trp	Asn	Thr	Glu	Arg		Met	Gly	Trp	Asn	Thr	Glu	Arg		Met	Gly	Trp	Asn	Thr	Glu	Arg	
= 3	= 7	= 1	= 6	= 5	= 11	= 3		= 1	= 2	= 1	= 3	= 2	= 5	= 3		= 2	= 1	= 0	= 8	= 3	= 10	= 7	
Pro	Ile	= Leu	Gln	Tyr	Sec	His		Pro	Ile	= Leu	Gln	Tyr	Sec	His		Pro	Ile	= Leu	Gln	Tyr	Sec	His	
= 2	6	= 9	= 1	= 4	= 0	= 1		= 1	5	= 4	= 1	= 1	= 0	= 1		= 1	6	= 2	= 2	= 1	= 0	= 1	

Abb. 7.4: Aminosäurezusammensetzungen der SASPs von *C. acetobutylicum*. Die Darstellung der proteinogenen Aminosäurereste wurde mit Hilfe des Isoelectric Point Calculators (Kozlowski, 2007-2013) erstellt. Jeweilige Anteile an Aminosäuren in den Proteinen sind unterhalb der 3-Buchstabenkürzungen angegeben. AS schwarz: unpolar, hydrophob; AS grün: polar, neutral; AS rot: sauer; AS blau: basisch.

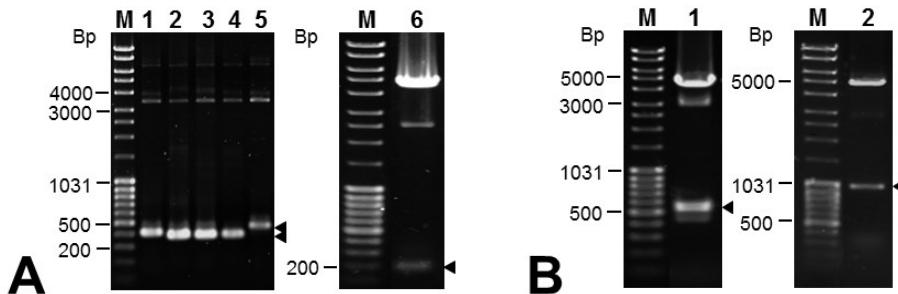


Abb. 7.5: Verifikation von *ssp*- (A), sowie *gpr*- und *yyAC*- (B) Gen-tragenden rekombinanten pT-Plasmiden. Dargestellt sind 0,8 % Agarosegele. (A) Für den Nachweis der *ssp* Gene wurden die jeweiligen Plasmide als Matrize in einer PCR (30 Zyklen) unter Verwendung der Oligonukleotide pT_fw und pT_rev (Tab. 7.1) eingesetzt, wobei die *ssp* Gene um zusätzliche 176 Bp vom Plasmid vergrößert waren und in Spur 1 mit *tlp* (401 Bp), Spur 2: *ssPB* (374 Bp), Spur 3: *ssPD* (368 Bp), Spur 4: *ssPA* (371 Bp) und Spur 5: *ssPF* (437 Bp) bestätigt werden konnten. Die Spur 6 zeigt die Kontrollrestriktion des Plasmids pT-catP::*ssPH* mit *Bam*HI und *Cfr*9I für den Nachweis des *ssPH*-Gens (174 Bp). (B) Die Plasmide wurden in einer Kontrollrestriktion mit *Bam*HI und *Cfr*9I eingesetzt. Dabei konnte in der Spur 1 das *gpr*-Gen (981 Bp) und in der Spur 2 das *yyAC*-Gen (564 Bp) bestätigt werden. M: MassRuler DNA Ladder Mix.

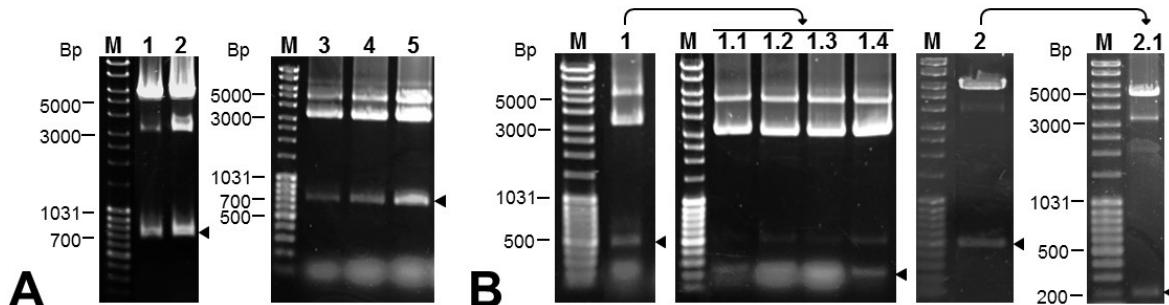


Abb. 7.6: Verifikation von Komplementations-Plasmiden. Dargestellt sind 0,8 % Agarosegele. (A) Der Nachweis der *ssp*-Gene und ihrer nativen *ssp*-Promotoren erfolgte durch eine Kontrollrestriktion der entsprechenden Plasmide mit *Pst*I und *Cfr*9I und konnte in Spur 1 für ^P*sspA*+*sspA* (695 Bp), Spur 2: ^P*sspF*+*sspF* (761 Bp), Spur 3: ^P*sspB*+*sspB* (698 Bp), Spur 4: ^P*sspD*+*sspD* (692 Bp) und Spur 5: ^P*sspH*+*sspH* (674 Bp) bestätigt werden. (B) Zeigt den Nachweis der *ssp*-Gene mit dem *sspA*-Promotor (Spuren 1.1-1.4) und dem *sspA*-Gen mit dem *sspF*-Promotor (Spur 2.1). Zunächst wurde in Spur 1 durch eine Kontrollrestriktion des Vektors pT-catP::^P*sspA* mit *Bam*HI und *Pst*I der Nachweis des *sspA*-Promotors (500 Bp) erbracht. In diesen Vektor wurden die Gene *sspB*, *sspD*, *sspF* und *sspH* kloniert. Der Nachweis auf eine erfolgreiche Klonierung erfolgte durch eine Kontrollrestriktion mit *Bam*HI und *Cfr*9I in der Spur 1.1 für *sspF* (264 Bp), Spur 1.2: *sspB* (201 Bp), Spur 1.3: *sspD* (195 Bp) und in Spur 1.4 für *sspH* (177 Bp). Die Spur 2 zeigt den Nachweis des *sspF*-Promotors (500 Bp) durch eine Kontrollrestriktion des Vektors pT-catP::^P*sspF* mit *Bam*HI und *Pst*I. In diesen Vektor wurde das Gen *sspA* kloniert. Der Nachweis auf eine erfolgreiche Klonierung erfolgte durch eine Kontrollrestriktion mit *Bam*HI und *Cfr*9I in der Spur 2.1 für *sspA* (198 Bp). M, Mass Ruler DNA Ladder Mix.

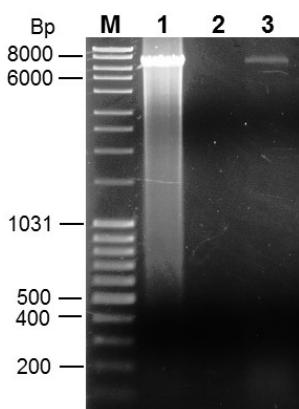


Abb. 7.7: Schutzfunktion von *C. acetobutylicum* Gesamtsporenprotein auf Plasmid-DNA. Linearisierte Plasmid-DNA (pT-catP, 1 µg pro Spur) wurde jeweils nur mit *A. dest*. (Negativ-kontrolle, Spur 1), nur mit DNase I (Positivkontrolle, Spur 2) oder mit DNase I und 6 µg an Gesamtsporenprotein analysiert (Spur 3). M, Mass Ruler DNA Ladder Mix. In dem Gesamtsporenprotein konnte ein Anteil an SspA von 11,15 % mittels MALDI-TOF-MS bestätigt werden.

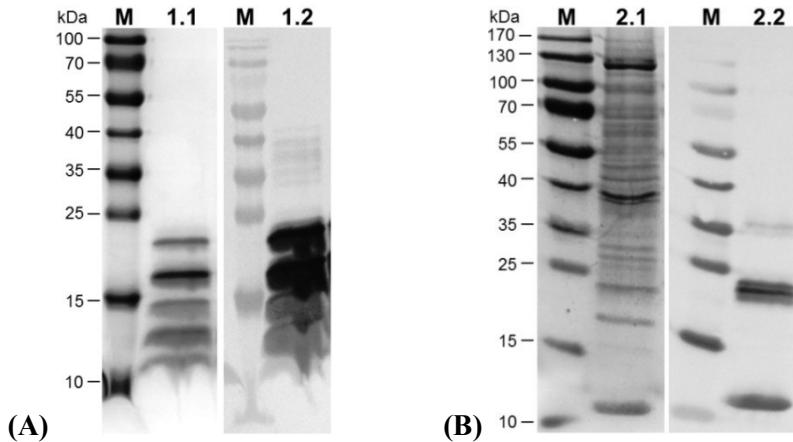


Abb. 7.8: Oligomerisierung bei dem rekombinant aus *E. coli* (A) und dem rekombinant aus *C. acetobutylicum* (B) gewonnenen Protein Tlp (Cac1487). Die Abbildungen zeigen SDS-Gradienten-PAGE mit jeweils 3 µg Protein pro Spur. Dabei ist in der Spur 1.1 das gewonnene Protein aus *E. coli* und in der Spur 2.1 das gewonnene Protein aus *C. acetobutylicum* dargestellt. Der Western Blot (Spuren 1.2 & 2.2) diente dem Nachweis der rekombinanten Strep-tag-Fusionsproteine mit Hilfe eines gegen den C-terminalen Strep-tag II gerichteten Antikörpers. M, PageRuler Prestained Protein Ladder.

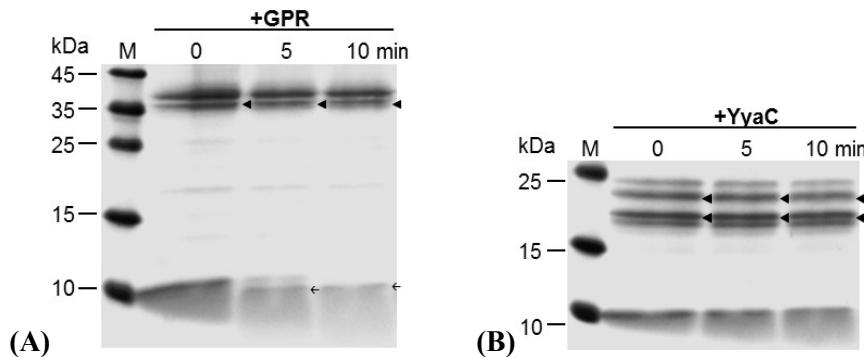


Abb. 7.9: Zeitabhängige Aktivierung der rekombinanten Proteasen GPR (A) und YyaC (B) von *C. acetobutylicum* in Autoprozessierungs-Puffer (Carroll & Setlow, 2005; mod.). Das Dreieck (◀) kennzeichnet mutmaßlich aktivierte und verkleinerte Proteinbanden der Proteasen und der Pfeil (←) markiert die ersten Spaltprodukte des rekombinanten SspB von *C. acetobutylicum* (2 µg pro Spur) durch die GPR. M, PageRuler Prestained Protein Ladder.

<i>Cac</i> CAC2857	-----MN-----KIKAFYNLPMAYYRLSNFLKHYYI-----DDN--	28
<i>Cpe</i> BAB81885.1	-----MN-----KIKIYYKNYLAYYEISNFLKNHI-----DEK--	28
<i>Cbo</i> YP_001252711.1	-----MN-----IEKIHYMESLSYYKIANTLKNYL-----NKD--	28
<i>Cdi</i> CAJ66949.1	-----MKGVFLLY-----LAKVNYSDDDVQLMLSSVLKTII-----NEN--	34
<i>Cdi</i> AJP09824.1	-----MY-----LAKVNYSDDDVQLMLSSVLKTII-----NEN--	28
<i>Cdi</i> WP_021367483.1	-----MLSSVLKTII-----NEN--	13
<i>Cpe</i> BAB82355.1	-----MCT-----SFYINSLDPKASFKIRDYLCRELSPVIKENRP	35
<i>Cbo</i> WP_012048448.1	-----MIS-----KTIIDTSIPDNISTLRDILCTELYAFKSNSRE	35
<i>Cac</i> CAC3727	-----MEK-----RIVFNVDDSNILYSFSNYLSSEIKS-IAVNRD	34
<i>Bsu</i> YYAC_BACSU	---MNRKGGLFSSQSERVKQYVSHTDAAAAKQIQTITLSSSLR--KAAGKP	44
<i>Cac</i> CAC1959	-----MY-----LEKYYYYKEKNIQEEFFKFLYFSMT---GKKEE	29
<i>Bme</i> ADF42057.1	---MNLKSPFFEKT-QHSTRVFHDEESATKKLSTQLLSLLP-AQKDRP	43
<i>Bce</i> NP_835133.1	MNIGSFRLPFFEK---ETQNVMHQDLEASEITISNFLTHIP--IKTNIP	44
<i>Cac</i> CAC1960	-----MEHFDDKSQQLKRNGFYFSYNVDKENIEHWISAILFQVLKDKED	43
	: :	

Abb. 7.10: Sequenzvergleiche des N-Terminus putativer YyaC-Proteasen ausgewählter *Clostridium* und *Bacillus* Vertreter. Das Sequenz-Alignment wurde mit Hilfe von Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) erstellt. Die vier putativen YyaC von *C. acetobutylicum* sind blau hervorgehoben und Aspartatreste in den Sequenzen grau unterlegt. Die Analysen ergaben, dass keine konservierten Sequenzen im N-Terminus von YyaC-Proteasen vorhanden sind. *Cac*: *C. acetobutylicum* ATCC 824, *Cpe*: *C. perfringens* str. 13, *Cbo*: *C. botulinum* ATCC 3502, *Cdi*: *C. difficile* CD630, *Bme*: *B. megaterium* DSM 319, *Bsu*: *B. subtilis* 168, *Bce*: *B. cereus* ATCC 14579. :, AS mit sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften

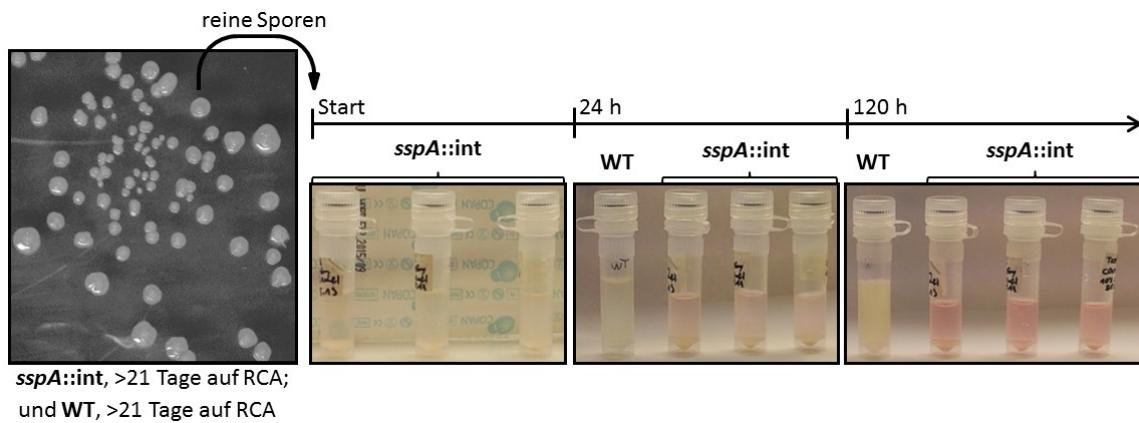


Abb. 7.11: Keimungsanalyse von Sporen des Wildtyps und der *sspA* Mutante von *C. acetobutylicum* nach einer Lagerung von 21 Tagen auf RCA-Festmedium. Zellen des Wildtyps und der *sspA* Mutante wurden aus CGM-Glycerin-Kultur (2.4) auf RCA-Medium ausgestrichen und für 21 Tage auf Platten inkubiert. Während dieser Zeit kam es zur Ausbildung von Sporen. Nach Ablauf der 21 Tage waren restliche vegetative Zellen nicht mehr vital und nur Sporen auf den Platten vorhanden. Diese Sporen wurde mit einer Impfschlinge abgenommen und in ca. 500-700 µl CGM-Medium (2.3.1) in 2-ml-Schraubdeckelröhren inokuliert. Die Schraubdeckelröhren wurden während des Experiments (0-120 h) unter anaeroben Bedingungen (Anaeroben-Werkbank, Meintrup, Lähden-Holte) bei 37 °C inkubiert. Im Vergleich zum Wildtyp, war die *sspA* Mutante auch nach 120 h Inkubation zu keinem Wachstum befähigt. Der Wildtyp zeigte bereits nach 24 h eine Trübung der optischen Dichte und war in der Lage aus Sporen auszuwachsen.

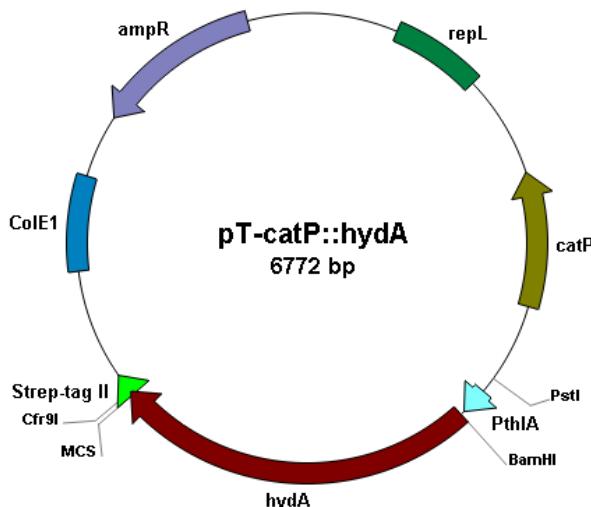


Abb. 7.12: Schematische Darstellung des pT-catP-Vektors (Girbal *et al.*, 2005, mod.). Das Shuttle-Plasmid wurde für die Expression C-terminaler Strep-tag® II Fusionsproteine unter Kontrolle des konstitutiven Thiolase-Promotors (PthlA) konstruiert und beinhaltet das clostridielle Gen *hydA*, welches *in frame* durch das gewünschte Zielgen ausgetauscht werden kann. Dargestellt ist der Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien (*repL*) und für *E. coli* (*ColE1*). Das Chloramphenicol/Thiamphenicol-Resistenzgen (*catP*) ermöglicht die Komplementation von ClosTron®-Insertionsmutanten (Heap *et al.*, 2007, 2010). Die Ampicillinresistenz (*ampR*) wird für die Expression von Proteinen in *E. coli* verwendet.

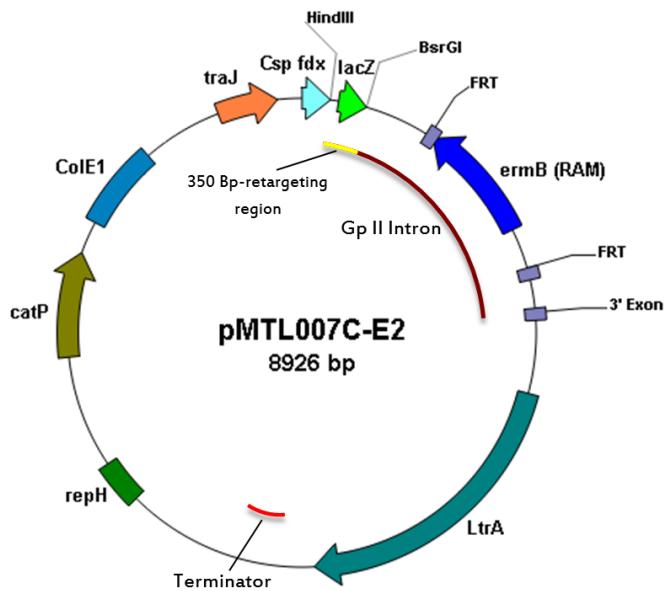


Abb. 7.13: Plasmidkarte von pMTL007C-E2 (Heap et al., 2010). Das modulare Plasmid der zweiten ClosTron® Generation beinhaltet unter Kontrolle des konstitutiven *fdx* Promotors von *C. sporogenes* ein mobiles Gruppe-II Intron, deren Insertion in das Zielgen durch das LtrA Protein (*L. lactis*) vermittelt wird. Flippase (FLP)-Erkennungsstellen (FRT) dienen wenn notwendig der Entfernung des retrotranspositionsaktivierten Selektionsmarker (RAM). Dargestellt ist der Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien (*repH*) und für *E. coli* (ColE1). Eine 350-Bp-Region des Gruppe II Introns wird mittels SOE-PCR an das Zielgen angepasst und nach Hydrolyse mit *HindIII* und *BrsGI* in den Vektor kloniert. Dabei kommt es zum *in frame* Austausch des *LacZα* ORFs durch das 350-Bp-Insert und zum Funktionsverlust der β-Galaktosidase.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn **Prof. Dr. Hubert Bahl** für das Vertrauen und die Möglichkeit zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten bedanken, sowie für die Freiheiten die er mir bei der Bearbeitung des Themas ließ.

Ein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Ralf-Jörg Fischer** für seine wissenschaftliche Betreuung in den letzten Jahren, die zahlreichen konstruktiven Gespräche und Ratschläge und insbesondere auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie der Universität Rostock bedanken, dabei besonders bei **Dr. Antje May** für die Unterstützung bei den FPLC-Analysen und zahlreichen Tipps und Tricks, aber auch bei **Ilona Boldt, Regina Karstädt, Monika Timm, Hella Goschke, Anne Lunze, Katja Zimmermann, Franziska Jenzen, Christoph Prohaska** und **Maria Lehmann** für Hilfestellungen jeglicher Art und die allseits gute Stimmung im Labor. Zudem möchte ich mich bei **Dr. Holger Janssen, Dr. Oliver Riebe, Dr. Mandy Wietzke, Dr. Dörte Lehmann, Dr. Miriam Mann, Dr. Franziska Schulz, Dr. Michael Scheel, Dr. Tina Lütke-Eversloh** und **Dr. Delyana Vasileva** für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt **Ronny Uhlig, Markus Klipp** und **Dr. Christine Voigt**, die mich bei den riesigen Batch-Kulturen unterstützt und unzählige Mengen an Glukose aufgezogen haben, aber natürlich auch für die schöne Zeit und die vielen lustigen Momente. Außerdem möchte ich mich bei Markus für die Durchsicht dieser Arbeit und die Bereitstellung der Vinylacetyl-CoA Delta-Isomerase bedanken.

Der **Landesgraduiertenförderung Mecklenburg-Vorpommern** danke ich für die finanzielle Förderung dieser Promotion.

Ein weiteres Dankeschön geht an **Dr. Marcus Frank** vom Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock für die Anfertigung der Transmissions- und Immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen und an **Dr. Brigit Voigt** vom Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald für die Durchführung der MALDI-TOF Analysen.

Ebenso danke ich **Dr. Stefan Timm** von der Abteilung Pflanzenphysiologie der Universität Rostock für die Bereitstellung der *Arabidopsis thaliana* DNA.

Bei meinen Freunden möchte sich mich für die schönen letzten Jahre in Rostock bedanken und dafür, dass sie stets ein offenes Ohr hatten und bei **Felician Reichert** für sein Verständnis und seine moralische Unterstützung.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner tollen Familie, meinen Eltern **Regina und Arnt Wetzel**, meinem Onkel **Andreas Köhn**, meinen beiden Brüdern **Mathias und Stephan Wetzel** und meiner süßen Nichte **Felja**, die stets für mich da waren und an mich glaubten und für schöne abwechslungsreiche Momente sorgten. Danke!

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und
keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Rostock, den 24.09.2015

Daniela Wetzel