



Heinrich Heine
Universität
Düsseldorf



**Fluoreszenzbasierte Systeme zum Nachweis der
Produktion und Sekretion von Proteinen in
*Bacillus subtilis***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Patrick Lenz

aus Mönchengladbach

Düsseldorf, Februar 2022

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Diese Arbeit wurde vom Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE, Grant-Nr.: 34-EFRE-0300096) im Rahmen des CLIB-Kompetenzzentrums Biotechnologie (CKB) gefördert.

Gedruckt mit der Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
2. Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2022

Meiner Familie

Veröffentlichungen

Volkenborn K., Kuschmierz L., Benz N., **Lenz P.**, Knapp A., Jaeger K.-E. (2020). The length of ribosomal binding site spacer sequence controls the production yield for intracellular and secreted proteins by *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell Fact.* **19**, 154.

Lenz P., Hilgers F., Burmeister A., Zimmermann L., Volkenborn K., Grünberger A., Kohlheyer D., Drepper T., Jaeger K.-E., Knapp A., (2021). The iSplit GFP assay detects intracellular recombinant proteins in *B. subtilis*. *Microb. Cell Fact.* **20**, 174.

Bakkes J. P., **Lenz P.**, Müller C., Bida A., Dohmen-Olma D., Knapp A., Oldiges M., Jaeger K.-E., Freudl R. (2021). Biosensor-based optimization of cutinase secretion by *Corynebacterium glutamicum*. *Front. Microbiol.* **28**, 12.

Müller C., Bakkes J. P., **Lenz P.**, Waffenschmidt V., Helleckes M. L., Knapp A., Jaeger K.-E., Wiechert W., Freudl R., Oldiges M. (2022). Accelerated strain construction and characterization of *C. glutamicum* protein secretion by laboratory automation. Manuskript eingereicht.

Lenz P., Bakkes J. P., Müller C., Malek M., Freudl R., Oldiges M., Drepper T., Jaeger K.-E., Knapp A. (2022). Combined *in vivo* split GFP assay and secretion stress biosensors allow holistic secretion monitoring in *Bacillus subtilis*. Manuskript in Vorbereitung.

Präsentationen im Rahmen der Promotion

Vorträge

Knapp A., **Lenz P.**, Volkenborn K., Kuschmierz L., Skoczinski P., Fulton A., Jaeger K.-E. (2019). Small changes with big impact – how single nucleotide or amino acid changes influence the production and secretion of recombinant proteins by *Bacillus subtilis*. RPP Konferenz, Kreta, Griechenland

Lenz P., Zimmermann L., Malek M., Grötschel L., Volkenborn K., Knapp A., Jaeger K.-E. (2019). Online monitoring of protein secretion by *Bacillus subtilis*. CKB-Symposium, Düsseldorf, Deutschland.

Lenz P., Malek M., Drepper T., Knapp A., Jaeger K.-E. (2022). Towards a holistic monitoring system for protein production and secretion in *Bacillus subtilis*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) 2022, virtuell.

Posterpräsentationen

Lenz P., Knapp A., Volkenborn K., Kuschmierz L., Malek M., Jaeger K.-E. (2018). Improving the applicability of split GFP assay for protein detection in *Bacillus subtilis*. BACELL, Bath, England.

Lenz P., Zimmermann L., Malek M., Volkenborn K., Knapp A., Jaeger K.-E. (2019). Activity-independent detection of intra- and extracellularly located recombinant protein produced by *Bacillus subtilis* using split GFP. RPP Konferenz, Kreta, Griechenland.

Lenz P., Bakkes J. P., Müller C., Malek M., Oldiges M., Freudl R., Drepper T., Knapp A., Jaeger K.-E. (2021). *In vivo* monitoring of protein production and secretion in *Bacillus subtilis*. CKB-Symposium, Düsseldorf, Deutschland

Klaus O., **Lenz P.**, Ölcucu G., Knapp A., Krauss U., Jaeger K.-E., Drepper T. (2021). Functionalization of polyester granules using plug&play systems. CKB-Symposium, Düsseldorf, Deutschland.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas sowie der Möglichkeit bedanken, dass ich meine Doktorarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie durchführen durfte. Weiter möchte ich mich für die engagierte Betreuung und Unterstützung im Laufe der letzten Jahre bedanken.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Im Speziellen möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Andreas Knapp bedanken. Danke, dass du mich die letzten Jahre gefördert und gefordert hast und ich dadurch der Wissenschaftler werden konnte, der ich jetzt bin. Auch möchte ich dir danken, dass du selbst nach deinem Weggang bei Fragen und der Durchsicht von Manuskripten und auch dieser Arbeit jederzeit zur Verfügung gestanden hast.

In dem gleichen Kontext möchte ich mich auch sehr herzlich bei Dr. Thomas Drepper bedanken. Danke Tom, dass ich in deiner Arbeitsgruppe eine neue Heimat finden durfte und dass du mich mit deiner stets herzlichen und aufbauenden Art vor allem in der Schreibphase dieser Dissertation beruhigen konntest. Ebenfalls möchte ich dir für die vielen Durchsichten von *Abstracts*, Postern und natürlich dieser Arbeit danken.

Vielen lieben Dank auch an Dr. Stephan Thies und Dr. Andrea Weiler für die Durchsicht dieser Arbeit, die aufmunternden Worte und die netten und anregenden Gespräche in den letzten Jahren. Danke, dass ihr für mich da wart.

Vielen Dank an meine wissenschaftlichen Kooperationspartner Dr. Patrick Bakkes, Carolin Müller, Prof. Dr. Marco Oldiges und Prof. Dr. Roland Freudl für die interessante und freundliche Kooperation als „bakterielle Sekretionsgruppe“ innerhalb des CKB. Danken möchte ich auch meinen Kooperationspartnern des iSplit GFP Papers: Alina Burmeister, Prof. Dr. Alexander Grünberger und Prof. Dr. Dietrich Kohlheyer für die Durchführung und Hilfe bei den mikrofluidischen Untersuchungen. In dem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Fabienne Hilgers für die Hilfe bei der Durchführung und den Analysen mit dem Durchflusszytometer danken. Auch einen lieben Dank an Marzena Malek, die mir mit lieben Worten und der Übernahme vieler eher unleidlicher Aufgaben im Laboralltag den Rücken gestärkt hat.

Weiter möchte ich mich bei **ALLEN** Mitgliedern der Drepper-Loeschcke-Thies AGs und im Besonderen bei Oli, Nora, Luzie, Robin und Fabienne dafür bedanken, dass ich mich sofort willkommen gefühlt habe und aus Kollegen Freunde geworden sind.

Bedanke möchte ich mich noch namentlich bei Jan Gebauer, Kristina Volkenborn, Dr. Christoph Strunk, Rebecka Molitor, Dr. Alexander Bollinger und Julia Berger. Ihr habt die Zeit meiner Doktorarbeit durch die vielen schönen und lustigen Gespräche wie auch die fachlichen Diskussionen bereichert. Auch **ALLEN** nicht namentlich genannten Kolleg:innen aus dem IMET danke ich für eine tolle Arbeitsatmosphäre und dem mehr als nur freundlichen Miteinander.

Ein besonderer Dank geht auch an „meine Studenten“ Alina, Melanie, Leonie, Nuka, Lana, Tobias und Tom, die ich auf ihrem wissenschaftlichen Weg unterstützen und begleiten durfte. Ich hoffe ihr hattet genauso viel Spaß und Freude an unserer Zeit wie ich. Danke, dass ich durch eure Betreuung so viel lernen durfte.

Natürlich möchte ich auch meinen Freunden danken. Danke, dass ihr die letzten Jahre für mich da wart, mir Verständnis entgegengebracht habt und (zumindest meistens) nicht böse reagiert habt, wenn ich mal wieder keine Zeit für euch hatte.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und Inga danken. Ich danke euch, dass ihr mich immer unterstützt und an mich geglaubt habt und ihr die Achterbahnfahrt der Gefühle der letzten Jahre nahezu anstandslos ertragen habt. Ohne euch wäre das alles gar nicht möglich gewesen! Besonders dir, Inga, möchte ich für die Unterstützung der letzten Jahre danken. Du hast nie an meinen Fähigkeiten gezweifelt und vor allem in der Schreibphase wohl am intensivsten meine Launen ertragen, mich immer wieder aufgebaut und mir gut zugeredet.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation mit dem Thema „**Fluoreszenzbasierte Systeme zum Nachweis der Produktion und Sekretion von Proteinen in *Bacillus subtilis***“ von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist. Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät eingereicht und ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen. Es handelt sich bei allen von mir eingereichten Dissertationsschriften um in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare. Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Mönchengladbach, den

Patrick Lenz

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	IV
Präsentationen	V
Danksagung	VI
Eidesstattliche Erklärung	VIII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungen	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Rekombinante Proteinproduktion und ihre Bedeutung für die Biotechnologie	1
1.2 <i>Bacillus subtilis</i> als Expressionswirt für rekombinante Proteine	2
1.3 Vom Gen zum biotechnologisch nutzbaren Protein	3
1.3.1 Proteinbiosynthese.....	4
1.3.2 Proteinsekretion in <i>B. subtilis</i>	11
1.4 Zielproteindetektion.....	18
1.4.1 Aktivitätsbasierte Detektionsmethoden	18
1.4.2 Fluoreszenzbasierte Detektionsmethoden	19
1.5 Zielsetzung.....	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien und Enzyme	25
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	25
2.3 Oligonukleotide.....	28
2.4 Arbeiten mit Bakterien	30
2.4.1 Nährmedien	30
2.4.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
2.4.3 Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	31

2.4.4	Kultivierung von <i>B. subtilis</i>	31
2.4.5	Herstellung und Transformation von natürlich kompetenten <i>B. subtilis</i> -Zellen...	33
2.4.6	Lagerung von Bakterien	33
2.4.7	Blau-Weiß-Selektion.....	33
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.5.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.5.2	QuikChange®-PCR.....	34
2.5.3	Agarosegelelektrophorese	35
2.5.4	Elution von DNA aus Agarosegelen	36
2.5.5	Reinigung von DNA.....	36
2.5.6	Isolierung von Plasmid-DNA.....	36
2.5.7	Isolierung von genomischer DNA	36
2.5.8	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	36
2.5.9	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	36
2.5.10	Sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung.....	37
2.5.11	Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
2.5.12	Sequenzierung von DNA.....	38
2.5.13	Bestimmung von Transkriptmengenänderungen mittels <i>real-time</i> qPCR.....	38
2.5.14	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	41
2.5.15	Herstellung von <i>B. subtilis</i> DB430 <i>knock-in</i> Mutanten mit der CRISPR/Cas9- Methode	41
2.6	Biochemische Methoden.....	45
2.6.1	Proteinpräzipitation	45
2.6.2	Bestimmung von Gesamtproteinkonzentrationen	45
2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.6.4	Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Cutinase	45
2.6.5	Bestimmung der β -Glukuronidaseaktivität.....	46
2.6.6	Produktion und Reinigung des Detektors für den Split GFP Assay	46

2.7	Fluoreszenzbasierte Methoden	47
2.7.1	Kultivierung und fluoreszenzbasierte Untersuchung von <i>B. subtilis</i> in mikrofluidischen Kammern mit Hilfe des iSplit GFP Assays	47
2.7.2	Durchflusszytometrie zur Analyse des iSplit GFP Assays in <i>B. subtilis</i>	48
2.7.3	Nachweis von Proteinen mittels Split GFP Assay in <i>B. subtilis</i>	49
2.7.4	Messung der zellulären Stressantwort auf die Proteinsekretion	51
2.7.5	Messung des kombinierten Systems zur Analyse der Produktion und Sekretion von Proteinen in <i>B. subtilis</i>	52
2.7.6	Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren	52
2.8	<i>In silico</i> Methoden	52
3	Ergebnisse und Diskussion	54
3.1	Ein Split GFP-basiertes <i>in vivo</i> Nachweissystem für cytosolische Proteine in <i>B. subtilis</i>	55
3.1.1	Der Split GFP Assay als <i>in vitro</i> Nachweismethode für intrazelluläre Zielproteine in <i>B. subtilis</i>	56
3.1.2	Die Nutzung des Zweiplasmidsystems beeinflusst die graduelle GUS11-Produktion nicht	59
3.1.3	Das Detektorprotein kann erst nach Optimierung der Transkriptstabilität in ähnlichen Mengen wie <i>sfGFP</i> produziert werden	61
3.1.4	Das Plasmid pHT01-iSplitGFP ermöglicht die <i>in vivo</i> Detektion von intrazellulären Zielproteinen	64
3.1.5	Der iSplit GFP Assay eignet sich als Methode zur <i>online</i> Überwachung der Proteinproduktion	66
3.1.6	Mit dem iSplit GFP Assay kann die Zielproteinproduktion auf Einzelzellebene analysiert werden	68
3.1.7	Resümee des iSplit GFP Assays	73
3.2	Kombinierte Nachweismethoden zur Analyse sekretierter Proteine in <i>B. subtilis</i>	75
3.2.1	Etablierung eines Sekretionsstress-Biosensors in <i>B. subtilis</i> DB430	77
3.2.2	Entwicklung eines minimal invasiven <i>in vivo</i> Split GFP Assay Ansatzes	84

3.2.3	Ein kombiniertes Nachweissystem für die Analyse der rekombinanten Proteinsekretion	91
3.3	Ein kombiniertes Nachweissystem für die rekombinante Produktion und Sekretion von Proteinen	98
3.3.1	Ein Drei-Sensor-Nachweissystem ist durch die Kombination der Fluoreszenzreporter P4, <i>sfGFP</i> und <i>mCherry</i> möglich.....	98
3.3.2	Kombinierte Analyse der Cut11-Sekretion.....	106
4	Zusammenfassung	114
5	Summary.....	116
6	Literaturverzeichnis.....	118
7	Anhang.....	147
7.1	Anhang zu Kapitel 3.1	147
7.2	Anhang zu Kapitel 3.2	148
7.3	Anhang zu Kapitel 3.3	152
8	Anteilerklärung an veröffentlichten Werken	154

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Der Prozess vom Gen zum biotechnologisch nutzbaren Protein in <i>B. subtilis</i>	4
Abb. 1.2: Schematische Darstellung bakterieller mRNA.....	8
Abb. 1.3: Das Prinzip der Sec-Sekretion in <i>B. subtilis</i>	14
Abb. 1.4: Aktivitätsbasierter Nachweis von Lipasen mit <i>para</i> -Nitrophenylpalmitat nach Winkler et al., 1979.	18
Abb. 1.5: Prinzip von fluoreszenzbasierten Biosensoren.....	20
Abb. 1.6: Die Prinzipien der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation und des darauf basierenden Split GFP Assays.....	22
Abb. 2.1: Prinzip der molekularbiologischen Nutzung von CRISPR/Cas9 zur Erzeugung von <i>knock-in</i> Mutanten.	42
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Insertionskassetten für die Konstruktion von <i>knock-in</i> Mutanten im <i>htrA</i> Locus von <i>B. subtilis</i>	43
Abb. 3.1: Mögliche Ereignisse der Sec-abhängigen Proteinsekretion, die in <i>B. subtilis</i> durch das kombinierte Nachweissystem erfasst werden sollen.	54
Abb. 3.2: Prinzip des Split GFP Assays als <i>in vivo</i> Detektionsmethode für cytosolische Proteine in <i>B. subtilis</i>	56
Abb. 3.3: Mit dem Split GFP Assay lassen sich graduelle Unterschiede der GUS11-Akkumulation nachweisen.	58
Abb. 3.4: Hydrolytische Aktivität der GUS11 und <i>sfGFP</i> -Fluoreszenz in einem Zweiplasmidsystem.	60
Abb. 3.5: Analyse der Protein- und Transkriptakkumulation von <i>sfGFP</i> und den Detektorvarianten GFP1-10 und GFP1-10(TGA11).	62
Abb. 3.6: Die graduelle GUS11-Produktion konnte mit dem iSplit GFP Assay nachgewiesen werden.	65
Abb. 3.7: Mit dem iSplit GFP Assay kann die GUS11-Produktion zeitaufgelöst betrachtet werden.	67
Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung einzelner <i>B. subtilis</i> -Zellen.....	69
Abb. 3.9: Cytoplasmatische Verteilung der GUS11 in <i>B. subtilis</i> -Zellen nachgewiesen über den iSplit GFP Assay.....	71
Abb. 3.10: Prinzip des kombinierten Nachweissystems für sekretierte Proteine in <i>B. subtilis</i>	76
Abb. 3.11: Evaluierung des <i>sfGFP</i> -basierten Sekretionsstress-Biosensors <i>B. subtilis</i> PAL4.	78
Abb. 3.12: Analyse der Cutinasesekretion mit verschiedenen Signalpeptiden.	81
Abb. 3.13: Etablierung eines nicht invasiven <i>in vivo</i> Split GFP Assays.	85
Abb. 3.14: Analyse der GFP1-10 Proteolyse in <i>B. subtilis</i>	87
Abb. 3.15: Etablierung eines nicht invasiven <i>in vivo</i> Split GFP-Ansatzes bei gleichzeitiger Repression der <i>wprA</i> Expression.	88

Abb. 3.16: Durch die Nutzung des <i>in vivo</i> Split GFP Assays konnte die sekretierte Cut11 quantifiziert werden.....	89
Abb. 3.17: Analyse der Cutinasesekretion bei einer Translationsoptimierung.....	92
Abb. 3.18: Signalpeptid-Screening der Cut11.....	95
Abb. 3.19: Evaluierung der cyan und gelb fluoreszierenden Detektorvarianten für den Nachweis extrazellulärer Cut11.....	100
Abb. 3.20: Evaluierung der cyan, gelb und blau fluoreszierenden Detektorvarianten für den Nachweis intrazellulärer GUS11.....	102
Abb. 3.21: Fluoreszenzemissionsspektren der in dieser Arbeit genutzten Fluoreszenzreporterproteine.....	104
Abb. 3.22: Modell des Drei-Sensor-Systems zur aktivitätsunabhängigen Analyse der Produktion und Sekretion von (rekombinanten) Proteinen in <i>B. subtilis</i>	106
Abb. 3.23: Kombinierte Analyse der Synthese und Sekretion der Cut11.....	107
Abb. 7.1: Korrelationen zwischen gemessenen Fluoreszenzintensitäten und Aktivitäten aus Kapitel 3.1.....	147
Abb. 7.2: In der Durchflusszytometrie gemessene Lichtbrechungseigenschaften von <i>B. subtilis</i> DB430 Doppeltransformanden.....	148
Abb. 7.3: <i>B. subtilis</i> Wuchsverhalten in unterschiedlichen Vollmedien.....	148
Abb. 7.4: Analyse der Signalpeptide SP _{PeI} , SP _{Bsn} und SP _{Epr}	149
Abb. 7.5: Hydrolytische Aktivitäten der mittels SP _{Epr} sekretierten Cut11 bei der Etablierung des <i>in vivo</i> Split GFP Assays.....	149
Abb. 7.6: <i>Online</i> Messung des Sekretionsstresses zu Abb. 3.13.....	150
Abb. 7.7: Korrelationsanalysen des kombinierten Nachweissystems für sekretierte Zielproteine in <i>B. subtilis</i> anhand der Cut11-Sekretion mit drei verschiedene Signalpeptiden und variierenden RBS-Spacern.....	151
Abb. 7.8: Korrelationsanalyse des kombinierten Nachweissystems für sekretierte Zielproteine in <i>B. subtilis</i> anhand eines Signalpeptid-Screenings für die Cut11. ...	152
Abb. 7.9: Nachweis extrazellulärer Cut11 über die hydrolytische Aktivität und dem Split FP Assay mit cyan und gelb fluoreszierenden Detektorvarianten.....	152
Abb. 7.10: Nachweis intrazellulärer GUS11 über die hydrolytische Aktivität und dem iSplit FP Assay mit cyan, gelb und blau fluoreszierenden Detektor-varianten.....	153

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.....	25
Tab. 2.2: Verwendete Plasmide.....	25
Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide.....	29
Tab. 2.4: Für <i>E. coli</i> genutzte Antibiotika zur Plasmidstabilisierung und die dazugehörige Regenerationszeit nach der Transformation.....	31
Tab. 2.5: Angewendete Parameter für <i>online</i> Messungen im Biolector.....	32
Tab. 2.6: Für <i>B. subtilis</i> genutzte Antibiotika und deren Konzentrationen.....	33
Tab. 2.7: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.....	34
Tab. 2.8: Reaktionsbedingungen der durchgeführten PCRs.....	34
Tab. 2.9: Reaktionsbedingungen für die QuikChange®-PCR.....	35
Tab. 2.10: Reaktionsbedingungen der reversen Transkription.....	39
Tab. 2.11: Parameter für das Programm Primer3 zur Generierung geeigneter Primer für die quantifizierende <i>real-time</i> PCR.....	40
Tab. 2.12: Programm der quantitativen <i>real-time</i> PCR.....	40
Tab. 2.13: Messparameter für den <i>in vitro</i> Split GFP Assay mit allen genutzten Detektorvarianten zur Zielproteindetektion.....	50
Tab. 2.14: Messparameter für den iSplit FP Assay mit den in dieser Arbeit genutzten Detektorvarianten.....	51
Tab. 2.15: Für die Messung der zellulären Stressantwort auf die (rekombinante) Proteinproduktion genutzte Parameter.....	51
Tab. 2.16: Messparameter bei der kombinierten Analyse der Produktion und Sekretion von Proteinen in <i>B. subtilis</i>	52
Tab. 2.17: Messparameter bei der Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren.....	52
Tab. 3.1: Aus Abb. 3.17 entnommene Split GFP-Fluoreszenzintensitäten und Aktivitäten zur Verdeutlichung des Sensitivitätsverlustes des <i>in vivo</i> Split GFP Assays.....	93
Tab. 3.2: Kalkulierte Korrelationen nach Pearson und dazugehörige Bestimmtheitsmaße zwischen hydrolytischer Aktivität und Sekretionsstress bei variierenden RBS-Spacern.....	93
Tab. 3.3: Bei der QuikChange®-PCR verwendete Primer zur Erzeugung der Expressionsplasmide der <i>sfGFP</i> -Varianten.....	104

Abkürzungen

A	Adenin
<i>A. dest</i>	<i>Aqua destillatum</i> (destilliertes Wasser, vollentsalzt)
AU	<i>arbitrary unit(s)</i> , willkürliche Einheit(en) für Fluoreszenzintensitäten
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C-terminal	Carboxy-terminal
C	Cytosin
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i> , CRISPR assoziiertes Protein 9
CFP	cyan fluoreszierendes Protein, Derivat des GFP
Cut(11)	Cutinase aus <i>Fusarium solani pisi</i> (mit C-terminalem GFP11-tag)
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> , DNA-Abschnitt mit regelmäßig verteilten kurzen palindromischen Wdhl. unterbrochen von Spacern
crRNA	CRISPR-RNA, bestehend aus Spacer-Sequenz und palindromischer Wdhl.
(k)Da	(Kilo-) Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunoassay
et al.,	<i>et alii</i> , und andere
EXLX1(-11)	Swollenin aus <i>Bacillus subtilis</i> (mit C-terminalem GFP11-tag)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , US-amerikanische Arzneimittelbehörde
FP	Fluoreszenzprotein
FtsY	SRP-Rezeptor
g	Gramm
<i>g</i>	x-fache Erdbeschleunigung

G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequoria victoria</i>
GFP1-10, Detektor	trunkiertes GFP ohne elftes β -Faltblatt
GFP11	elftes β -Faltblatt des GFP
ggf.	gegebenenfalls
GRAS	<i>generally recognized as safe</i> , allgemein als sicher anerkannt; Zulassungsbezeichnung der FDA
GTP	Guanosintriphosphat
GUS(11)	β -Glukuronidase aus <i>Escherichia coli</i> (mit C-terminalem GFP11- <i>tag</i>)
h	<i>hour(s)</i> , Stunde(n)
HR	homologe Rekombination
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
iSplit FP Assay	intrazellulärer <i>in vivo</i> Split FP Assay
kPa	Kilopascal
LB	<i>lysogeny broth</i> , komplexes Nährmedium
LV	Leervektor
l	Liter
IF	Initiationsfaktor
iSplit GFP Assay	intrazellulärer <i>in vivo</i> Split GFP Assay
M	Molar
MFE	minimale freie Energie
min	Minuten
Mrd.	Milliarden
mRNA	<i>messenger</i> RNA, Boten-RNA
MTP	Mikrotiterplatte
NAD(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Hydrid)
NaDoc	Natriumdesoxycholat
NADP(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat(-Hydrid)
nt	Nukleotid(e)
N-terminal	Amino-terminal
OD _{580nm}	optische Dichte bei 580 nm
OD _{620nm}	optische Dichte bei 620 nm
oLB	optimiertes LB-Medium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAM	Proto-Spacer angrenzendes Motiv
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , Wasserstoffionenexponent
PI	Propidiumiodid
Pi	Phosphat
PiP	posttranslational interagierendes Protein
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
pNPG	<i>para</i> -Nitrophenyl- β -D-Glukuronid
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylpalmitat
Proto-Spacer	Zum Spacer komplementärer DNA-Abschnitt zur gezielten Ausrichtung des DSB durch die Cas9
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
R ²	Bestimmtheitsmaß
RBS	Ribosomenbindestelle
RBS-Spacer	Ribosomenbindestellenspacer
RF	<i>release factor</i> , Freisetzungsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> , ribosomale RNA
RNA-P	DNA-abhängige RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur
SD	Shine-Dalgarno
Sec-Sekretion	allgemeiner Sekretionsweg
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
sfGFP	<i>superfolder GFP</i>
sgRNA	<i>single guide RNA</i> , synthetisches RNA-Molekül bestehend aus crRNA und tracrRNA
SLIC	<i>sequence and ligation independent cloning</i> , sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung
sek	Sekunde(n)
SP	Signalpeptid
SP _(Pel/Epr/Bsn/NprE)	Signalpeptid des extrazellulären Proteins Pel/Epr/Bsn/NprE
Spacer	DNA-Abschnitt des CRISPR-Arrays zwischen den palindromischen WdhI.

SPase I	Signalpeptidase des Typs I
SRP	<i>signal recognition particle</i> , Signalerkennungspartikel
Tat	<i>twin-arginine translocation</i> , Zwillingsarginin-Translokation
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T	Thymin
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i> , RNA-Molekül mit zur crRNA komplementärem DNA-Abschnitt und zusätzlichem Bereich für die Cas9-Bindung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	<i>transfer RNA</i> , transfer-RNA
U	<i>unit(s)</i> (Enzymeinheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
USD	US-Dollar
UTR	untranslatierte Region
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
Wdhl.	Wiederholung
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XynA(11)	Xylanase A aus <i>Bacillus subtilis</i> (mit C-terminalem GFP11-tag)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein, Derivat des GFP
z.B.	zum Beispiel
$\lambda_{Em.}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{Ex.}$	Anregungswellenlänge
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Rekombinante Proteinproduktion und ihre Bedeutung für die Biotechnologie

Bereits seit mehreren Tausend Jahren werden Mikroorganismen unbewusst im biotechnologischen Sinne bei der Fermentation von Lebensmitteln oder dem Brauen von Bier genutzt (Verma et al., 2011). Erst im letzten Jahrhundert wurde durch die erste erfolgreiche Transformation eines Mikroorganismus und die Erkenntnis, dass die DNA der Träger genetischer Informationen ist, der Grundstein der modernen Biotechnologie mit der Produktion von rekombinanten Proteinen gelegt (Griffith, 1928, Avery et al., 1944). Dabei sind per Definition rekombinante Proteine solche, die durch genetisch veränderte Mikroorganismen produziert wurden (Schein, 1989). Dieser Prozess findet Verwendung, wenn bei der Nutzung des nativen Wirtes die Proteinausbeute zu gering ausfällt (Mital et al., 2021). Seit der ersten erfolgreichen rekombinanten Produktion eines Proteins in den 1970er-Jahren konnte bis heute ein breites Produktspektrum in den verschiedensten Industriezweigen wie der Pharma-, Diagnostik-, Textil-, Nahrungsmittel-, Polymer- und Plastikindustrie erschlossen werden (Itakura et al., 1977, Demain et al., 2009, Chen et al., 2020). Die Wichtigkeit der rekombinanten Proteine für die Industrie lässt sich an mehreren Stellen einfach aufzeigen. So wurden bereits 1993 mit *Escherichia coli* Produkte wie Insulin oder Interferone im Wert von etwa 5 Mrd. USD hergestellt (Demain et al., 2009). In der Pharmaindustrie sind die Biopharmazeutika die am rasantesten wachsende Produktgruppe. Im Zeitraum von 2002 bis 2009 wurden über 200 neue Peptid- und Proteinpharmazeutika zugelassen und von 2014 bis Mitte 2018 waren mehr als 87 % der neuen biopharmazeutischen Produkte Proteine (Demain et al., 2009, Rader et al., 2018, Walsh, 2018). Zusätzlich nahm auch der Anteil von rekombinant produzierten Enzymen sukzessive zu, sodass im Jahr 2014 bereits 90 % der industriellen Enzyme rekombinanten Ursprungs waren (Adrio et al., 2014, Johannes et al., 2006, Kumar et al., 2013). Enzyme sind Biokatalysatoren, dies bedeutet, dass sie, ohne selbst in der chemischen Reaktion verbraucht zu werden, die Aktivierungsenergie absenken können, wodurch enzymatische Reaktionen unter deutlich mildereren Bedingungen (Temperatur, pH-Wert oder Druck) ablaufen können (Koeller et al., 2001, Ricca et al., 2007). Enzyme haben den weiteren Vorteil, dass sie im Vergleich zu typisch chemischen Katalysatoren enantioselektiv sind und sich daher chirale Moleküle einfacher herstellen lassen (Adrio et al., 2014). Dies macht Enzyme zu geeigneten, umweltschonenden Alternativen im Vergleich zu ihren chemischen Gegenspielern (Chen et al., 2020, Chapman et al., 2018), sodass 2014 schon bei etwa 150 industriellen Prozessen Enzyme

oder Ganzzellkatalysen genutzt wurden (Adrio et al., 2014). Im Jahr 2020 hatte der weltweite Enzymmarkt eine jährliche Zuwachsrate von 8,2 % und erzielte 2021 7,5 Mrd. USD; diese soll bis 2024 auf etwa 10 Mrd. USD anwachsen (Rigoldi et al., 2018, Ashok et al., 2021, Abdelraheem et al., 2019). Im Laufe der Jahre konnte ein breites Spektrum an biotechnologisch nutzbaren eukaryotischen und prokaryotischen Produktionsorganismen etabliert werden. Die bekanntesten Vertreter der eukaryotischen Wirte sind *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* und chinesische Hamsteroovarien (CHO)-Zellen, wohingegen es bei den Prokaryoten *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* sowie *Clostridium* Spezies sind (Tripathi et al., 2019, Rettenbacher et al., 2021). Diese große Vielfalt ermöglicht die Nutzung des optimalen Produktionsstammes für die rekombinante Produktion entsprechend den Eigenschaften des Zielproteins. Beispielsweise wird bei der Produktion eines Proteins, das für seine Funktion komplexe posttranslationale Modifikationen benötigt, eher mit eukaryotischen Organismen wie CHO-Zellen gearbeitet (Müller, 2018, Amann et al., 2019). Simple Proteine hingegen werden vermehrt in Prokaryoten erzeugt, da diese deutlich einfacher und kosteneffizienter zu kultivieren sind (Rettenbacher et al., 2021). Im Folgenden wird hauptsächlich auf *Bacillus subtilis* und seine Bedeutung für die industrielle Biotechnologie eingegangen.

1.2 *Bacillus subtilis* als Expressionswirt für rekombinante Proteine

B. subtilis ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges und Endosporen bildendes Bodenbakterium mit niedrigem GC-Gehalt der DNA (Earl et al., 2008). Es wurde das erste Mal 1872 von Ferdinand Cohn aus Heuaufgüssen isoliert und beschrieben (Errington et al., 2020, Cohn, 1872). Als ubiquitär vorkommendes Bodenbakterium hat *B. subtilis* einen vielseitigen Metabolismus entwickelt, um jederzeit auf schnell wechselnde Umweltbedingungen reagieren zu können (Su et al., 2020). Große Aufmerksamkeit erregte *B. subtilis* bereits in den 1950er-Jahren, als es als erster nicht pathogener Mikroorganismus erfolgreich transformiert werden konnte (Spizizen, 1958). Zusätzlich konnte das Genom von *B. subtilis* nur wenige Monate nach dem von *E. coli* vollständig sequenziert werden (Kunst et al., 1997, Blattner et al., 1997). Diese zwei wichtigen Ereignisse trugen maßgeblich dazu bei, dass *B. subtilis* der Modellorganismus für Gram-positive Bakterien geworden ist. Die zusätzliche Etablierung von einigen große Datenbanken wie das *SubtiWiki*, in denen die bisher durch verschiedenste Analysen gewonnenen Erkenntnisse über *B. subtilis* zusammengetragen wurden, erleichtern dabei die Arbeit mit diesem Organismus (Gu et al., 2018, Pedreira et al., 2021). Biotechnologisch wird eine Unterart von *B. subtilis* schon seit etwa 1000 Jahren für die Gewinnung des japanischen

Gerichtes „Natto“ verwendet (Shurtleff et al., 2012). Heutzutage ist *B. subtilis* sogar einer der meist genutzten Mikroorganismen in der industriellen Biotechnologie (Liu et al., 2013, Schallmey et al., 2004). Das Produktspektrum dieses Organismus reicht von Antibiotika über Nukleotide, Riboflavine, homologe Enzyme wie Proteasen und Amylasen bis zu einer nicht unerheblichen Anzahl an rekombinanten Proteinen (Su et al., 2020, Stein, 2005, Kunst et al., 1997, Gu et al., 2018, Barbe et al., 2009). Alleine 2004 wurden mit der Gattung der *Bacilli* bis zu 60 % der industriell hergestellten Enzyme und Proteine erzeugt (Westers et al., 2004). Dies liegt an einigen spezifischen Eigenschaften dieses Organismus. *B. subtilis* verfügt weder über Endo- noch über Exotoxine, was einer der Gründe ist, dass seine Produkte von der *Food and Drug Administration* (FDA) mit dem GRAS-Status (*generally recognized as safe*) versehen wurden (Harwood et al., 1996). Zusätzlich hat *B. subtilis* keine spezifische Codonverwendung, kann kostengünstig in großen Mengen fermentiert werden und ist einfach genetisch zu modifizieren (Schallmey et al., 2004, Spizizen, 1958, Moszer et al., 1995). Der größte Vorteil bei der Nutzung von *B. subtilis* gegenüber anderen Organismen wie etwa *E. coli* ist der sehr leistungsfähige Sekretionsapparat. Durch diesen können in industriell angepassten Stämmen bis zu 25 g Protein pro Liter Kulturmedium sekretiert werden (Schallmey et al., 2004, Neef et al., 2020). Mit der Sekretion des Zielproteins ins Kulturmedium können bis zu 50-80 % der Kosten im *Downstream*-Prozess eingespart werden, da die Schritte der Zelllyse und Abtrennung von cytosolischen Proteinen entfallen (Labrou, 2014, Schallmey et al., 2004). Deshalb wird auch heute noch viel Arbeit in die Entwicklung von Werkzeugen zur Stammoptimierung und in die Stammoptimierung selbst investiert (Zhang et al., 2020, Yang et al., 2021).

1.3 Vom Gen zum biotechnologisch nutzbaren Protein

Bei der biotechnologischen Nutzung birgt die (rekombinante) Sekretion von Zielproteinen einige Vorteile gegenüber der intrazellulären Produktion. Das Verständnis der einzelnen Schritte und ihrer regulatorischen Mechanismen ist von herausragender Bedeutung. Im Nachfolgenden wird daher der gesamte Prozess vom Gen bis zum biotechnologisch nutzbaren sekretierten Protein in die Schritte der Transkription, Translation und Sekretion aufgegliedert und näher beleuchtet (Abb. 1.1).

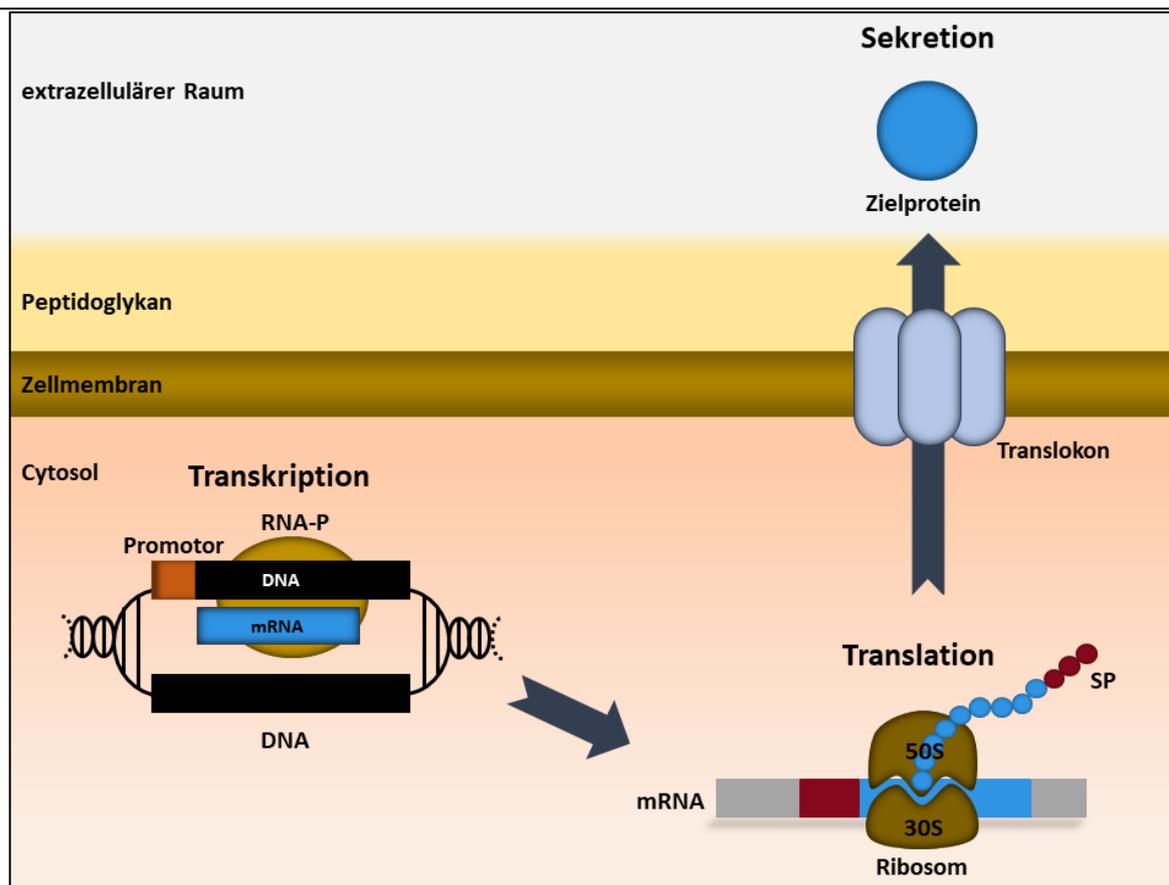


Abb. 1.1: Der Prozess vom Gen zum biotechnologisch nutzbaren Protein in *B. subtilis*. Der gesamte Prozess der biotechnologischen Produktion lässt sich in Transkription, Translation und Sekretion aufteilen. Bei der Transkription wird die DNA durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-P) ab einer spezifischen Initiationssequenz (Promotor) in die Boten-RNA (mRNA) umgeschrieben. Anschließend wird auf Basis der mRNA bei der Translation das Zielprotein synthetisiert. Diese Synthese wird durch das Ribosomen, das sich aus einer 30S und einer 50S Untereinheit zusammensetzt, bewerkstelligt. Um von der Translokationsmaschinerie erkannt zu werden, verfügen zu sekretierende Proteine über ein N-terminales Signalpeptid (SP). Mit Hilfe dieses SPs kann das Protein bei der Sec-Sekretion ungefaltete über das Translokon in den extrazellulären Raum sezerniert werden, wo es seine native Konformation einnimmt und für die biotechnologische Nutzung verfügbar ist.

Der gesamte Prozess vom Gen zum Protein ist für das Überleben des Organismus essenziell und daher streng reguliert. Diese Regulation kann durch gezielte molekulare Eingriffe verändert werden und zur Optimierung der Proteinproduktion führen (Li et al., 2004, Schumann, 2007, Zhang et al., 2020). Die einzelnen Prozesse unterscheiden sich zwischen Eukaryoten und Prokaryoten teilweise sehr stark. In dieser Arbeit wird daher nur auf die bakteriellen Prozesse mit dem Hauptaugenmerk auf *B. subtilis* eingegangen.

1.3.1 Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese beschreibt den gesamten Prozess vom Gen bis zum Protein. Dieser Prozess lässt sich in die Schritte Transkription und Translation aufteilen.

1.3.1.1 Transkription

Die Transkription ist der erste Schritt der Proteinbiosynthese. Hier wird die DNA durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-P) zur Boten-RNA (*messenger* RNA, mRNA) transkribiert. Die bakterielle RNA-P setzt sich aus den Untereinheiten α , α' , β , β' und ω zusammen (Haldenwang, 1995, Browning et al., 2004, Doherty et al., 2010). Erst in Kombination mit einem σ -Faktor kann die RNA-P an sequenzspezifischen DNA-Abschnitten, die Promotoren genannt werden, binden und die Transkription initiieren. Organismen verfügen über mehrere σ -Faktoren, die sich in ihren Affinitäten zu verschiedenen Promotoren unterscheiden (Mooney et al., 1998, deHaseth et al., 1998, Zhang et al., 2015). *B. subtilis* verfügt als sehr anpassungsfähiger Organismus über 17 verschiedene σ -Faktoren, wobei σ^A als Haushalts- σ -Faktor agiert und während des Wachstums und der frühen Sporulation produziert wird (Shank et al., 2011, Haldenwang, 1995). Nach der erfolgreichen Bindung des RNA-P- σ -Komplexes an eine Promotorsequenz, wird ein kurzes Stück der Doppelhelix in 3'-Richtung entwunden, bevor der codogene DNA-Strang in 3'-Richtung transkribiert wird (Guo et al., 1998, Burgess, 1971). Nach der Synthese eines kurzen mRNA-Abschnitts dissoziiert der σ -Faktor von der RNA-P, womit die Transkription in die Elongationsphase eingeht (Saecker et al., 2011, Browning et al., 2016). Sollte während der Transkription ein zum DNA-Strang nicht komplementäres Nukleotid am 3'-Ende eingebaut werden, induziert dies eine Konformationsänderung der RNA-P, wodurch die Transkriptionselongation gestoppt wird. Anschließend induzieren Gre-Faktoren die Abspaltung des fehlerhaften Nukleotids von der mRNA (Sydow et al., 2009, Erie et al., 1993). Die Transkription kann über zwei unterschiedliche Mechanismen beendet werden, die von der ATPase Rho-abhängig oder -unabhängig sind. Bei der Rho-abhängigen Termination bindet die RNA-abhängige ATPase Rho, welche hochkonserviert und nahezu ubiquitär in Bakterien vorkommt, an zwei Stellen der mRNA und trennt mit ihrer RNA:DNA-Helikaseaktivität den Elongationskomplex voneinander (Washburn et al., 2015, Opperman et al., 1994, Lowery-Goldhammer et al., 1974, Brennan et al., 1987). Da nur etwa 6% der Transkriptionsterminationen in *B. subtilis* Rho-abhängig sind, wird die Mehrheit der Transkriptionen in diesem Organismus über die Rho-unabhängige, auch intrinsische Termination genannt, beendet (de Hoon et al., 2005). Bei dieser bildet sich am 3'-Ende des Transkripts eine GC-reiche Haarnadelstruktur. Durch die starke intramolekulare GC-Bindung dieser Struktur dissoziiert die RNA-P von der mRNA (Gusarov et al., 1999, Washburn et al., 2015).

1.3.1.1.1 Promotoren

Promotoren sind für die Transkriptionsinitiation unerlässlich und befinden sich -10 bis -35 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Mooney et al., 1998). Sie bestehen aus der Pribnow-Box (auch -10 Region genannt) mit der Konsensussequenz 5'-TATAAT-3' und der -35-Region (5'-TTGACA-3' für σ^A) und werden durch einen 17 nt langen DNA-Abschnitt getrennt (Huang et al., 1998, Pribnow, 1975, Moran et al., 1982, Haldenwang, 1995). Die Stärke eines Promotors wird über die Ähnlichkeit zu den Konsensussequenzen der Pribnow-Box und der -35-Region definiert. Starke Promotoren sind solche, die eine hohe Sequenzähnlichkeit und damit auch eine erhöhte Affinität gegenüber den σ -Faktoren aufweisen. Dies führt über eine erhöhte Transkriptionsinitiation zu größeren mRNA-Mengen als bei schwachen Promotoren (Wang et al., 1984, Li et al., 2004). Promotoren sind seit Jahrzehnten ein beliebter Angriffspunkt für die Steigerung der Zielproteinausbeute. So werden starke native Promotoren zweckentfremdet und für die Zielgenexpression genutzt (Guan et al., 2015a, Guan et al., 2016). Immer öfter werden aber auch synthetische Promotoren durch die Fusion von Promotorelementen verschiedener Promotoren oder durch die Mutagenese von vorhandenen Promotoren erzeugt (Phan et al., 2012, Phan et al., 2015). Auch die Nutzung von dualen Promotorsystemen wird immer beliebter. Durch die kombinierte Nutzung von beispielsweise einem σ^A -abhängigen und einem σ^B -abhängigen Promotor kann das Zielprotein sowohl während der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase in *B. subtilis* produziert werden (Wang et al., 1984, Öztürk et al., 2017, Zhang et al., 2017, Liu et al., 2018). Promotoren können unabhängig von ihrer Stärke in induzierbare und konstitutive Promotoren eingeteilt werden.

Konstitutive Promotoren

Konstitutive Promotoren ermöglichen beim Vorhandensein des passenden σ -Faktors eine kontinuierliche Genexpression. Im zellbiologischen Kontext regulieren diese Promotoren die Transkription von sogenannten Haushaltsgenen, deren Genprodukte für das zelluläre Überleben unabdingbar sind (Haldenwang, 1995). Bekannte konstitutive Promotoren für die rekombinante Proteinproduktion in *B. subtilis* sind der P_{HpaII} , der P_{43} , oder der P_{veg} Promotor (Wong et al., 1984, Moran et al., 1982, Wang et al., 1984).

Induzierbare Promotoren

Im Vergleich zu konstitutiven Promotoren initiieren induzierbare Promotoren die Transkription erst nach der Bindung eines Induktors. Natürlicherweise dienen induzierbare Promotoren dazu, dass die Zelle auf sich verändernde Umweltbedingungen reagieren kann. Induktoren für die Regulation sind vielfältig und können etwa Licht, Temperatur oder spezifische Moleküle sein (Neubauer et al., 1992, Facciotti et al., 1985, Breitling et al., 1990) und dabei die Transkription

positiv oder negativ regulieren. Bei der positiven Regulation aktiviert der Induktor einen Aktivator, wodurch die Transkriptionsinitiation möglich wird. Im Unterschied dazu inaktiviert der Induktor bei der negativen Regulation einen Repressor, der dann nicht mehr an der DNA binden kann (Siegele et al., 1997, Rosano et al., 2014). Für *B. subtilis* wurden bereits einige induzierbare Promotorsysteme entwickelt, die mit verschiedensten Molekülen wie Saccharose oder Xylose induziert werden können (Steinmetz et al., 1985, Bhavsar et al., 2001). Der in dieser Arbeit genutzte P_{grac} ist ein künstlich erzeugter Promotor, der aus dem Promotor des *groESL*-Operons und der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz des Gens *gsiB* aus *B. subtilis* (Jürgen et al., 1998, Meijer et al., 2004, Helmann, 1995) und dem *lac*-Operator und Repressor LacI des *lac*-Operons aus *E. coli* zusammengesetzt wurde (Ullmann, 2001, Phan et al., 2006, Nguyen et al., 2007). Beim *lac*-Operon als negativ reguliertes System bindet der konstitutiv produzierte Repressor LacI an die Operatorsequenz, welche zwischen Promotor und Zielgen liegt, und verhindert damit die Transkription. Bei Anwesenheit des Induktors Lactose bindet diese am Repressor und führt zu einer Konformationsänderung, durch die dieser nicht weiter am Operator binden und damit die Transkription stattfinden kann. Das *lac*-Operon ist eine der am häufigsten genutzten Regulationseinheiten für synthetische induzierbare Promotoren. Da Lactose den meisten Organismen als Nahrungsquelle dient, muss für eine dauerhaft gleichbleibende Transkription kontinuierlich Lactose zugeführt werden. Aus diesem Grund wurde mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ein Lactoseanalogon entwickelt, welches nicht degradiert werden kann und dessen Konzentration damit über die gesamte Kultivierung konstant bleibt (Ullmann, 2001).

Der biotechnologische Nachteil induzierbarer Promotoren gegenüber den konstitutiven ist, dass für die Induktion teilweise kostenintensive Stoffe wie IPTG genutzt werden müssen (Kapralek et al., 1991, Neubauer et al., 1991). Jedoch kann durch die Verwendung induzierbarer Systeme die Zellproliferation und die Proteinproduktion entkoppelt werden, womit Zellwachstum und Proteinproduktion nicht um die gleichen Ressourcen konkurrieren.

1.3.1.1.2 Bakterielle mRNA

Struktureller Aufbau bakterieller mRNA

Alle bakteriellen mRNAs haben einen ähnlichen Aufbau (Abb. 1.2).

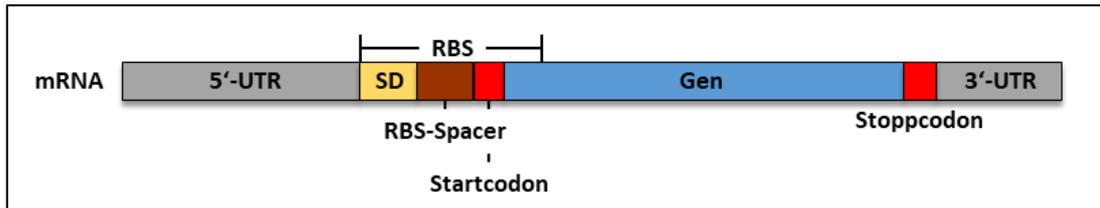


Abb. 1.2: Schematische Darstellung bakterieller mRNA. Bei der hier gezeigten monocistronischen mRNA liegt das Gen zwischen dem Start- und Stoppcodon der Translation und wird zusätzlich von den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) flankiert. Die für die Translation wichtige Ribosomenbindestelle (RBS) besteht aus der SD-Sequenz, dem Startcodon, mit einem Ribosomenbindestellenspacer (RBS-Spacer) dazwischen und den ersten Codons des Gens. Modifiziert nach Volkenborn et al., 2020. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0) geschützt.

Sie verfügen über einen kodierenden Bereich, der am 5'-Ende von einem Startcodon und am 3'-Ende von einem Stoppcodon flankiert wird. Das häufigste Startcodon in *B. subtilis* ist dabei ATG, gefolgt von TTG und GTG. Als Stoppcodons fungieren TAA, TGA und TAG mit absteigender Wahrscheinlichkeit (Rocha et al., 1999). Der kodierende Bereich, welcher bei monocistronischer mRNA ein einzelnes Gen ist, trägt die Informationen für die Proteinsynthese in Form von Codons. Bei einem Codon handelt es sich um ein Basentriplett bestehend aus den Nukleobasen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Uracil (U). Wenn ein Basentriplett nicht für ein Start- oder Stoppcodon kodiert, kodiert es für eine der 20 kanonischen Aminosäuren (Crick, 1968). Die mRNA besitzt zusätzliche untranslatierte Regionen (UTRs) am 5'- und am 3'-Ende. Die 5'-UTR trägt die für die Translationsinitiation erforderliche Ribosomenbindestelle (RBS), welche aus der SD-Sequenz, dem Startcodon, einem variablen dazwischen liegenden Ribosomenbindestellenspacer (RBS-Spacer) und den ersten Nukleotiden der kodierenden Sequenz besteht (Volkenborn et al., 2020, Chen et al., 1994, Unoson et al., 2007). Die SD-Sequenz ist entscheidend für die Ribosomenbindung und bindet das 3'-Ende der ribosomalen 16S rRNA (Kapitel 1.3.1.2). Weiterhin haben die beiden UTRs Einfluss auf die Stabilität und Degradation der mRNA (Carrier et al., 1997, Sharp et al., 2005, Condon, 2003, Bechhofer et al., 2008, Lechnik-Habrink et al., 2012).

mRNA Abbau

Die Regulation der Transkription erfolgt sowohl über die Transkriptionsstärke durch verschiedene (induzierbare) Promotoren als auch über die mRNA-Stabilität (Grunberg-Manago, 1999). So ist etwa eine hohe Instabilität ein wichtiger Faktor bei der schnellen zellulären Antwort auf veränderte Umweltbedingungen (Kushner, 2002, Grunberg-Manago, 1999). Die durchschnittliche Halbwertszeit von mRNA in *B. subtilis* als sich schnell anpassender

Organismus liegt daher auch nur bei etwa fünf Minuten (Hambraeus et al., 2003). *B. subtilis* hat 18 verschiedene Endo- und Exoribonukleasen für die RNA-Degradation, wobei nur fünf RNasen (III, J1, P, Y und Z) essenziell sind (Lehnik-Habrink et al., 2012). Von besonderer Bedeutung für die mRNA-Degradation in *B. subtilis* sind dabei die RNasen Y und J1. Bei der RNase Y-abhängigen Degradation hydrolysiert diese die mRNA endonukleolytisch. Anschließend können die beiden dabei entstandenen Fragmente in 3'-5'-Richtung von der PNPase und in 5'-3'-Richtung von der RNase J1 degradiert werden (Yao et al., 2010, Durand et al., 2012a, Lehnik-Habrink et al., 2012). Ein durch Deletion erzeugter Aktivitätsverlust der RNase Y kann zu einer erhöhten Stabilität von mRNAs von fünf auf über 20 Minuten führen, dies unterstreicht die Wichtigkeit dieser RNase (Shahbadian et al., 2009, Lehnik-Habrink et al., 2011, Durand et al., 2012a).

Bei der RNase J1-abhängigen Degradation gibt es zwei potenzielle Mechanismen. So kann zum einen exonukleolytisch durch die Pyrophosphohydrolase RppH das Triphosphat am 5'-Ende der mRNA zu Monophosphat hydrolysiert werden, womit anschließend die RNase J1 die mRNA vom 5'-Ende aus degradiert (Richards et al., 2011, Mathy et al., 2007, Lehnik-Habrink et al., 2012). Die Alternative wäre ähnlich zur RNase Y-abhängigen Degradation, dass die RNase J1 endonukleolytisch die mRNA in zwei Fragmente spaltet, die dann erneut in 3'-5'-Richtung von der PNPase und in 5'-3'-Richtung von der RNase J1 degradiert werden (Yao et al., 2007, Lehnik-Habrink et al., 2012, Deikus et al., 2009).

1.3.1.2 Translation

Bei der Translation, die der zweite Prozess der Proteinbiosynthese ist, wird die in der Transkription gewonnene mRNA für die Synthese des Proteins genutzt. Die Translation lässt sich ebenso wie die Transkription in Initiation, Elongation und Termination unterteilen.

Translationsinitiation

Das prokaryotische 70S Ribosom setzt sich aus der kleinen (30S) und der großen (50S) Untereinheit zusammen. Die 30S Untereinheit enthält 21 Proteine und ein 16S rRNA-Molekül, wohingegen die 50S Untereinheit aus 23S und 5S rRNA und 34 ribosomalen Proteinen aufgebaut ist. Beide Untereinheiten besitzen drei Bindepositionen (Aminoacyl (A)-, Peptidyl (P)- und Exit (E)-Position) für die *transfer*-RNA (tRNA; Ramakrishnan, 2002, Schmeing et al., 2009). Die tRNA besteht aus 73 bis 95 Nukleotiden (nt) eines einzelnen RNA-Stranges, welcher über intramolekulare Basenpaarung eine sogenannte Kleeblattstruktur mit vier Domänen unterschiedlicher Funktionen einnimmt. Der als Akzeptor-Arm bekannte Bereich, welcher aus beiden Enden der RNA besteht, dient zur Anbindung von Aminosäuren an die tRNA über eine

Aminoacylbindung. Mit dem Anticodon-Arm kann die tRNA an komplementäre Codons der mRNA für die sequenzspezifische Translation binden. Die beiden anderen Arme (Dihydrouracil-Arm und Pseudouracil-Arm) haben hauptsächlich Anteil an der Stabilität der tRNA-Moleküle (Giegé, 2008, Avçilar-Kucukgoze et al., 2020, Sigler, 1975).

Die Translation wird durch die Bindung der 30S Untereinheit an die mRNA initiiert. Dafür wechselwirken die SD-Sequenz der mRNA mit der Anti-SD-Sequenz der 16S rRNA (Rocha et al., 1999, Shine et al., 1975). Zusätzlich binden noch die beiden Initiationsfaktoren IF1 und IF3 an die 30S Untereinheit. IF1 blockiert dabei die A-Position des Ribosoms und verhindert dadurch die Bindung von tRNAs. Die IF3 inhibiert die Entstehung des 70S Ribosomenkomplexes (Ramakrishnan, 2002, Gualerzi et al., 2015, Elvekrog et al., 2013) und die GTP-gebundene GTPase IF2 bindet die Initiator-tRNA (Formylmethionyl-tRNA, tRNA^{fMet}, Shazand et al., 1990). Durch die Blockierung der A-Position wird die tRNA^{fMet} mit Hilfe von IF2 direkt in die P-Position der 30S Untereinheit geleitet, wo sie mit dem Startcodon der mRNA wechselwirken kann. Dieser 30S Präinitiationskomplex erfährt durch die GTP-Hydrolyse von IF2 eine Konformationsänderung zum 30S Initiationskomplex, wobei die Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3 dissoziieren. Mit der anschließenden Bindung der 50S Untereinheit entsteht der 70S Initiationskomplex (Gualerzi et al., 2015, Gualerzi et al., 1990). Die Effizienz dieser Komplexbildung ist der limitierende Schritt bei der Translation und wird maßgeblich von der RBS und den angrenzenden Bereichen stromaufwärts und stromabwärts beeinflusst (Abb. 1.2; Hershey et al., 2012, Sauer et al., 2018). So kann die Komplexbildung durch die Nutzung von sogenannten starken SD-Sequenzen, die mit der Anti-SD-Sequenz des Organismus komplementär sind, deutlich verbessert werden (Vellanoweth et al., 1992). Die Ausbildung von stabilen mRNA-Sekundärstrukturen in und um den Bereich der RBS hingegen, kann die Initiation deutlich verringern (Goodman et al., 2013, Sauer et al., 2018). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Translationsinitiation ist der RBS-Spacer, da angenommen wird, dass dieser für die korrekte Positionierung des Startcodons in der P-Position des Ribosoms verantwortlich ist und bei suboptimalen Längen die Initiation stört (Vellanoweth et al., 1992). Darauf aufbauend konnte für *B. subtilis* gezeigt werden, dass mit der Variation dieses RBS-Spacers bis zu einem Optimum, welches meist bei einer Länge von 8 bis 10 Nukleotiden (nt) liegt, auch die Zielproteinmenge graduell gesteigert werden kann (Volkenborn et al., 2020).

Translationselongation

Bei dem 70S Initiationskomplex liegt die tRNA^{fMet} in der P-Position des Ribosoms und für die Elongation wird das nächste tRNA-Molekül durch den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) zur A-Position transportiert. Wie IF2 ist auch EF-Tu eine GTPase, die den Transport der tRNA nur in

GTP-gebundener Konformation durchführen kann (Voorhees et al., 2013, Rodnina et al., 2016). Bei erfolgreicher Codon-Anti-Codon Wechselwirkung zwischen mRNA und tRNA wird das an EF-Tu gebundene GTP zu GDP+Pi hydrolysiert. Dies resultiert in einer Konformationsänderung des Elongationsfaktors. Dabei wird die Bindung zwischen EF-Tu und tRNA gelöst und EF-Tu dissoziiert vom Komplex (Voorhees et al., 2013, Kapp et al., 2004, Åqvist et al., 2015). Wenn sowohl in der A-Position als auch in der P-Position tRNAs vorliegen, bildet sich durch die räumlichen Gegebenheiten die Peptidbindung zwischen den beiden Aminosäuren der tRNAs aus. Gleichzeitig wird die Esterbindung zwischen der tRNA und Aminosäure in der P-Position gespalten. In der P-Position befindet sich anschließend eine deacylierte tRNA und in der A-Position die Peptidyl-tRNA (Rodnina, 2013). Für die Verschiebung des Ribosoms auf der mRNA in 3'-Richtung ist der Elongationsfaktor G (EF-G) zuständig. EF-G, welcher ebenfalls eine GTPase ist, bindet in GTP-gebundener Konformation an den Ribosomenkomplex. Durch Hydrolyse des GTPs erfahren Ribosom und EF-G eine Konformationsänderung, durch die sich das Ribosom auf der mRNA in 3'-Richtung um eine Codonlänge verschiebt. Die damit in der E-Position liegende deacylierte tRNA dissoziiert anschließend ebenso spontan vom Ribosomenkomplex wie EF-G (Holtkamp et al., 2014a, Holtkamp et al., 2014b). Da gleichzeitig die Peptidyl-tRNA von der A- in die P-Position verschoben wurde, kann ein erneuter Elongationsschritt erfolgen und die wachsende Peptidkette wird bei jeder Verlängerung weiter aus dem Ribosomentunnel ausgeschleust (Rodnina et al., 2016).

Translationstermination

Das Signal der Translationstermination ist gegeben, wenn eines der Stoppcodons die A-Position des Ribosoms erreicht, da es zu diesen keine passenden tRNAs gibt (Brenner et al., 1965). Abhängig von dem vorliegenden Stoppcodon bindet einer der beiden Freisetzungsfaktoren (*release factor*, RF) an das Stoppcodon (RF1: UAG, UAA; RF2: UAA, UGA) und bewirkt die Hydrolyse der Esterbindung zwischen Peptidkette und tRNA an der P-Position (Nakamura et al., 2011). Das Peptid wird anschließend durch den Ribosomentunnel aus dem Ribosomenkomplex entlassen und zu seinem Bestimmungsort transportiert. RF3 katalysiert dann die Dissoziation von RF1/RF2 und der Ribosomenkomplex zerfällt in seine Untereinheiten (Youngman et al., 2008, Kisselev et al., 2003).

1.3.2 Proteinsekretion in *B. subtilis*

Neben der Synthese von intrazellulären Proteinen sekretiert *B. subtilis* auch etwa 300 unterschiedliche Proteine zur Nährstoffaufnahme, Zell-Zell-Kommunikation oder zur Anpassung an äußere Umweltfaktoren (Tjalsma et al., 2004). In *B. subtilis* werden die meisten

der sekretierten Proteine ungefaltet über den generellen Sekretionsweg (Sec) transportiert (Zhang et al., 2020, Wang et al., 2015, Tjalsma et al., 2004). Da über diesen Sekretionsweg bereits bis zu 25 g Protein pro Liter Kulturmedium in den extrazellulären Raum sezerniert werden konnten, stellt dieser den bevorzugten Weg für die industrielle Anwendung dar (Neef et al., 2020, Quax, 1997). Einige meist kofaktorabhängige Proteine falten jedoch bereits im Cytosol und werden anschließend über den Tat-Weg (*twin-arginine translocation*) sekretiert (Monteferrante et al., 2013, Freudl, 2018).

1.3.2.1 Signalpeptide

Proteine, die über den Sec- oder Tat-Weg sekretiert werden, verfügen über ein N-terminales Signalpeptid. Dieses ist für die korrekte Zuweisung des Sekretionsweges unerlässlich. Alle Sec- und Tat-Signalpeptide weisen den gleichen charakteristischen dreigeteilten Aufbau aus positiv geladener N-Region, hydrophober H-Region und polarer C-Region auf (von Heijne, 1990, Tjalsma et al., 2004, Freudl, 2018).

Die N- und H-Regionen interagieren beide mit Teilen der Translokationsmaschinerie und beeinflussen durch verschiedene Faktoren den Transport in den extrazellulären Raum (Peterson et al., 2003, Natale et al., 2008, Lee et al., 2001, Cunningham et al., 1989, Akita et al., 1990). Die Bindungsstärke der Interaktion wird durch die Länge und Hydrophobizität der H-Region reguliert und spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Transportrate und Wahl des Sekretionsweges (Freudl, 2018, Izard et al., 1994, Ryan et al., 1993, Wang et al., 2000, Duffy et al., 2010). Ein zusätzlich wichtiger Faktor ist die positive Nettoladung der N-Region die unerlässliche elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phospholipiden in der Zellmembran ermöglicht (Tjalsma et al., 2004, De Vrije et al., 1990, Li et al., 2006, Lammertyn et al., 1998, Inouye et al., 1982, Freudl, 2018, Faß et al., 1996, Caspers et al., 2010). Die C-Region ist meist kurz und trägt die Erkennungssequenz für eine der Signalpeptidasen des Typs I (SPase I; Konsensussequenz: A-X-A), um das Signalpeptid nach der erfolgreichen Translokation vom Protein abzutrennen (von Heijne, 1984, Rusch et al., 2007). Durch das Angleichen der C-Region an die Konsensussequenz konnte bei der rekombinanten Proteinsekretion eine Sekretionssteigerung erreicht werden (Ravn et al., 2003, Guan et al., 2015b). Die Sec-Sekretion kann kotranslational oder posttranslational erfolgen (Kap 1.3.2.2). Signalpeptide, die für die kotranslationale Sekretion vermitteln, sind meist länger und hydrophober als jene, die für die posttranslationale Sekretion vermitteln (Von Heijne et al., 1989, Tjalsma et al., 2000, Valent et al., 1997, Lee et al., 2001).

Tat-Signalpeptide verfügen meist über eine längere N-Region und eine weniger hydrophobe H-Region im Vergleich zu Sec-Signalpeptiden. Am Übergang beider Regionen befindet sich mit der Konsensussequenz S/T-R-R-X-F-L-K das namensgebende und für die Sekretion essenzielle Zwillingarginin-Motiv (Palmer et al., 2012, Cristóbal et al., 1999, Berks, 1996). Zusätzlich dazu weisen die C-Regionen von Signalpeptiden für die Tat-Sekretion positiv geladene Aminosäuren auf, wodurch diese nicht von der Maschinerie der Sec-Sekretion erkannt werden können (Blaudeck et al., 2003, Freudl, 2018, Cristóbal et al., 1999).

Durch diese konservierte Struktur ist es heutzutage möglich das Vorhandensein von Signalpeptiden mit Algorithmen wie beispielsweise „SignalP“ oder „Phobius“ voraussagen zu lassen (Teufel et al., 2021, Käll et al., 2007, Garcion et al., 2021). Signalpeptide beeinflussen verschiedene Aspekte sowohl der Proteinbiosynthese als auch der anschließenden Sekretion, wodurch es nicht möglich ist, bei der rekombinanten Proteinsekretion vorherzusagen, welche Kombination von Signalpeptid und Zielprotein eine gute Proteinausbeute gewährleistet. Daher ist eine der wichtigsten Methoden zu Beginn der Etablierung eines neuen Zielproteins das Screening von großen homologen oder heterologen Signalpeptid-Banken (Degering et al., 2010, Brockmeier et al., 2006a, Freudl, 2018).

1.3.2.2 Sec-Sekretion

Die Sec-Sekretion kann abhängig vom Signalpeptid kotranslational oder posttranslational ablaufen (Abb. 1.3).

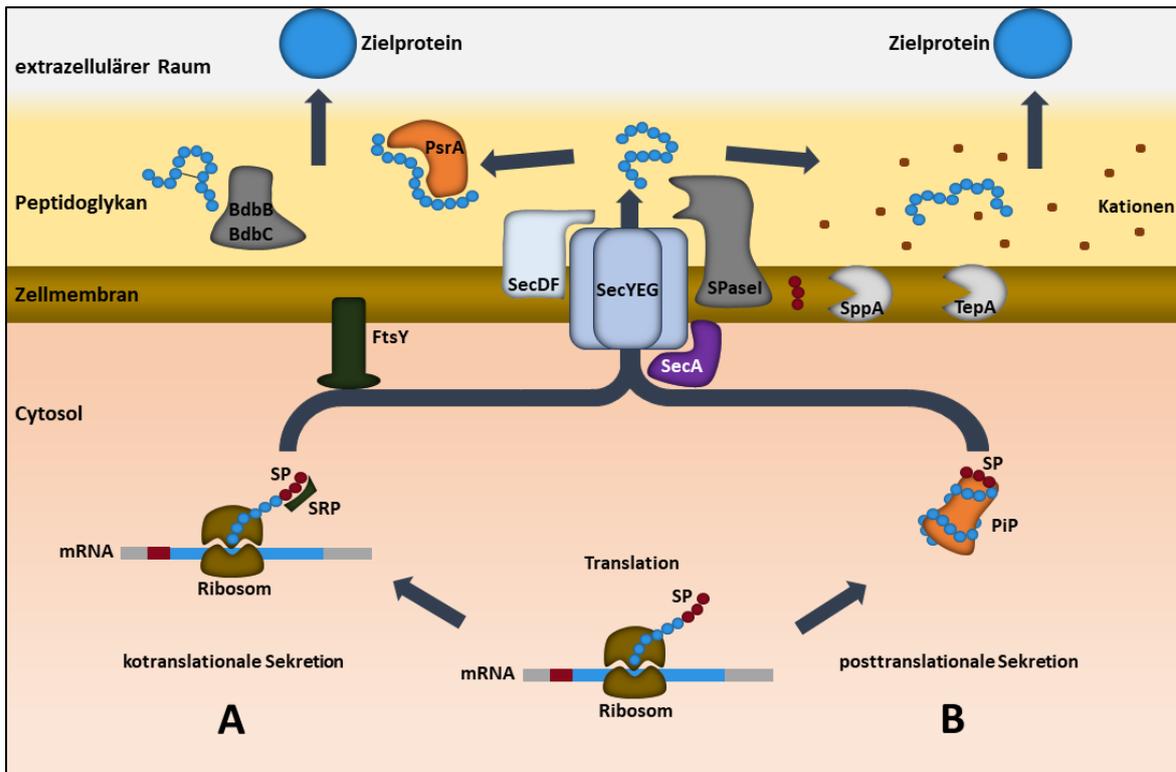


Abb. 1.3: Das Prinzip der Sec-Sekretion in *B. subtilis*. Bei der Sec-Sekretion werden ungefaltete Proteine auf zwei unterschiedlichen durch das Signalpeptid vermittelten Wegen sekretiert. **A** Bei der kotranslationalen Sekretion wird das meist hydrophobere und längere Signalpeptid (SP) bereits kurz nach Verlassen des Ribosomentunnels durch das Signalerkennungspartikel (SRP) erkannt und gebunden. Das SRP transportiert dann, unterstützt durch den SRP-Rezeptor FtsY, den Ribosomen-Polypeptid-Komplex zur Translokationspore SecYEG. Dort wird durch die Interaktion der Proteine der Sec-Maschinerie der Ribosomentunnel zur Translokationspore ausgerichtet, sodass das Polypeptid ohne cytoplasmatische Exposition über die Membran transportiert wird. Die Energie für die Translokation wird dabei zum einen aus der Translationselongation und zum anderen aus der ATP-Hydrolyse von SecA gewonnen. **B** Bei der posttranslationalen Sekretion wird das weniger hydrophobe und auch kürzere Signalpeptid erst nach der Translation von einem in *B. subtilis* noch nicht näher definierten Chaperon, auch posttranslational interagierendes Protein (PiP) genannt, erkannt. Dieses PiP inhibiert die Faltung des Zielproteins und transportiert dieses zur Translokationspore SecYEG, wo es unter ATP-Hydrolyse von SecA über die Membran transloziert wird. Bei beiden Sec-Sekretionstypen wird die Translokation durch SecDF unter Nutzung der protonenmotorischen Kraft beschleunigt. Wenn die C-Domäne des Signalpeptides das Translokon verlässt, wird dieses durch eine der fünf Signalpeptidasen des Typs I (SPase I) vom Zielprotein abgespalten und von einer der Signalpeptidpeptidasen SppA oder TepA degradiert. Das Zielprotein faltet währenddessen im Peptidoglykan mit Hilfe des Chaperons PrsA oder einem der anderen chaperonartigen Faktoren (Kationen, Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen BdbB/BdbC) in seine native Konformation und gelangt in den extrazellulären Raum.

Die meisten Proteine werden in *B. subtilis* kotranslational sekretiert, wobei das Signalpeptid von dem Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle*, SRP) erkannt und gebunden wird (Hirose et al., 2000, Honda et al., 1993, Nakamura et al., 1999). Das SRP ist ein Ribonukleoprotein bestehend aus Ffh und jeweils einer kleinen cytoplasmatischen RNA (Nakamura et al., 1994). Zusätzlich gehören in *B. subtilis* noch zwei Moleküle des HbsU Proteins

zum SRP (Yamazaki et al., 1999, Akopian et al., 2013). Bereits während der Translation beim Verlassen des Ribosomentunnels, wenn das Peptid etwa 70 bis 150 Aminosäuren lang ist, bindet das SRP an das Signalpeptid (Luirink et al., 2005, Fekkes et al., 1999). Der SRP-Ribosom-Polypeptidkomplex wird über die Interaktion mit dem membrangebundenen SRP-Rezeptor (FtsY) zum SecYEG Translokon transportiert (Yamane et al., 2004, Tjalsma et al., 2004, Harwood et al., 2008). Am Translokon angelangt, dissoziieren SRP und FtsY, während die für die Translokation benötigte ATPase SecA durch die Bindung mit dem Signalpeptid mit SecYEG interagieren kann (van Wely et al., 2001, Elvekrog et al., 2015, Connolly et al., 1991, Connolly et al., 1989). Der Ribosomentunnel wird dabei auf die Translokationspore ausgerichtet, sodass das Polypeptid ohne cytosolische Exposition direkt in das Translokon translatiert werden kann (Tjalsma et al., 2004, Elvekrog et al., 2015). Die für die Translokation benötigte Energie wird anschließend aus der ATP-Hydrolyse von SecA und hauptsächlich aus der Translationselongation gewonnen (van der Wolk et al., 1997, Schiebel et al., 1991, Du Plessis et al., 2011). Zusätzlich sitzt in der Membran noch das Fusionsprotein SecDF, welches unter Nutzung der protonenmotorischen Kraft die Translokation beschleunigt (Tsukazaki et al., 2011, Bolhuis et al., 1999b).

Bei der posttranslationalen Sekretion wird das Signalpeptid des Proteins nach der Translation von einem posttranslational interagierenden Protein (PiP) gebunden. In *E. coli* ist dieses PiP SecB (Bechtluft et al., 2010). *B. subtilis* verfügt über kein zu SecB homologes Protein (Tjalsma et al., 2000). Es konnte aber in Komplementationsstudien gezeigt werden, dass CsaA zumindest in *E. coli*-Deletionsmutanten die Funktion von SecB komplementieren konnte (Müller et al., 2000, Müller et al., 1992). Weitere mögliche PiPs für die posttranslationale Sekretion in *B. subtilis* könnten noch die allgemeinen Chaperone GroEL-GroES oder Dnak-DnaJ-GrpE sein (Wu et al., 1998, Lyon et al., 1998, Freudl, 2013). Die PiPs halten das zu sekretierende Protein in einer ungefalteten Konformation und transportieren es zum SecYEG Translokon. Die Translokation findet dann ähnlich zur SRP-abhängigen Sekretion unter ATP-Hydrolyse von SecA statt (Freudl, 2018, Freudl, 2013). Sobald die C-Region des Signalpeptides SecYEG an der extracytoplasmatischen Seite verlässt, wird das Signalpeptid durch eine SPase I vom Zielprotein unabhängig von der Sekretionsart abgespalten (Tjalsma et al., 2000, Dalbey et al., 1992, Dalbey et al., 1997). *B. subtilis* verfügt über fünf verschiedene SPasen I (SipS, SipT, SipU, SipV und SipW). Die Mehrheit der homologen Signalpeptide werden von SipS und SipT hydrolysiert, wohingegen die anderen drei eine höhere Substratspezifität aufweisen und nur eine untergeordnete Rolle spielen (van Roosmalen et al., 2004, Tjalsma et al., 1997, Tjalsma et al., 1998). Nach der Hydrolyse durch eine SPase I wird das in der Membran verbliebene

Signalpeptid von den Signalpeptidpeptidasen SppA oder TepA degradiert (Bolhuis et al., 1999a), während das Zielprotein mit Hilfe von extrazellulären Chaperonen oder chaperonartigen Faktoren seine native Konformation einnimmt (Zhang et al., 2020). Einer dieser Faltungshelfer ist das Lipoprotein PrsA, welches in der extracytosolischen Seite der Zellmembran verankert ist (Kontinen et al., 1991). PrsA ist in die Zellmembransynthese involviert aber auch bei der Faltung von Sec-sekretierten Proteinen unerlässlich (Hyyryläinen et al., 2010, Vitikainen et al., 2004, Tjalsma et al., 1999). Bei den chaperonartigen Faltungshelfern handelt es sich beispielsweise um metallische Kationen am Übergang zwischen der Zellmembran und dem Peptidoglykan. Diese lagern sich dort vermehrt aufgrund der negativen Nettoladung des Peptidoglykans an. Viele Proteine benötigen diese Kationen für ihre Faltung, Stabilität und auch Aktivität (Zhang et al., 2020, Hyyryläinen et al., 2000, Harwood et al., 2008). Andere Faltungshelfer sind die Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen BdbB und BdbC, die für die Ausbildung von Disulfidbrücken in extrazellulären Proteinen verantwortlich sind (Zhang et al., 2020, Harwood et al., 2008). Bei nicht erfolgreicher Faltung aggregieren die Proteine an dem Übergang zwischen Zellmembran und Peptidoglykan. Diese Aggregate können die Membranintegrität stören, weshalb *B. subtilis* mit dem CssRS Zweikomponentensystem über ein Qualitätskontrollsystem verfügt. Die Proteinaggregate werden in diesem System von der membranintegralen Histidinkinase CssS erkannt. Diese phosphoryliert als Antwort den Rezeptor CssR, welcher anschließend durch Wechselwirkungen mit dem Promotorbereich der Proteasegene *htrA* und *htrB* deren Produktion hochreguliert. HtrA und HtrB degradieren anschließend die Proteinaggregate an der Zellmembran. Diese zelluläre Antwort wird auch Sekretionsstress genannt, da diese durch die Überproduktion der sekretierten α -Amylase ausgelöst werden konnte (Hyyryläinen et al., 2001, Westers et al., 2006, Darmon et al., 2002). Das Qualitätskontrollsystem ist hoch konserviert und in vielen Organismen zu finden (Danese et al., 1995, Jurischka et al., 2020). Auch bei korrekter Faltung sind in *B. subtilis* sekretierte Proteine anfällig für die Degradation durch eine der acht extrazellulären oder die membrangebundene Protease WprA (Westers et al., 2004, Zhang et al., 2020). Für die Ausbeutensteigerung von sekretierten Proteinen wurden über die Jahre verschiedene Optimierungsstrategien hinsichtlich des Sekretionsprozesses entwickelt. So konnten positive Erfolge durch die Überproduktion von essenziellen Proteinen wie dem SRP, SecYEG, den SPasen I oder PrsA erzielt werden (Mulder et al., 2013, Malten et al., 2005, Chen et al., 2015). Auch die durch vermehrte Anreicherung von metallischen Kationen im Peptidoglykan oder durch die Produktion von heterologen Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen konnten die Ausbeute gesteigert werden (Vitikainen et al., 2005, Kouwen et al., 2008). Ebenfalls ist die Nutzung von

Protease-defizienten *B. subtilis*-Stämmen eine sehr gebräuchliche Herangehensweise (Zhang et al., 2020, Zhang et al., 2018a).

1.3.2.3 Tat-Sekretion

Im Vergleich zur Sec-Sekretion, bei der nur ungefaltete Proteine sekretiert werden können, können bei der Tat-Sekretion Proteine in ihrer nativen Konformation über die Zellmembran transloziert werden (Freudl, 2013). Tat-Substrate sind Proteine, die entweder einen im Cytosol befindlichen Kofaktor für ihre Aktivität und/oder Faltung benötigen oder solche, die für die Sec-Sekretion zu schnell falten (Palmer et al., 2012, Freudl, 2018). In Gram-positiven Organismen mit geringem GC-Gehalt wie *B. subtilis* baut sich das Tat-Translokon aus den Proteinen TatA und TatC zusammen (Freudl, 2018). Für die Translokation bindet das Signalpeptid des gefalteten Proteins an dem Heterodimer TatAC in der Zellmembran, wo dieses als Substratrezeptor fungiert (Freudl, 2018, Lausberg et al., 2012, Alami et al., 2003). Anschließend werden unter Nutzung der protonenmotorischen Kraft TatA-Multimere zum Substratrezeptor rekrutiert (Mori et al., 2002), die entweder eine Pore zur Translokation bilden oder alternativ die Zellmembran schwächen, sodass das Protein hindurch diffundieren kann (Gohlke et al., 2005, Freudl, 2018, Brüser et al., 2003).

1.4 Zielproteindetektion

Für die industrielle Biotechnologie müssen rekombinante Proteine nicht nur effizient produziert, sondern auch einfach, kosteneffizient und am besten im Hochdurchsatz detektiert werden können. Im Laufe der Zeit wurden viele verschiedene Quantifizierungsmethoden etabliert.

1.4.1 Aktivitätsbasierte Detektionsmethoden

Die Mehrheit der Detektionsmethoden beruht auf der Bestimmung der Zielproteinmenge über die enzymatische Umsetzung von Surrogat-Substraten, deren Reaktionsprodukte photo- oder fluorometrisch nachgewiesen werden können (Goddard et al., 2004a, Goddard et al., 2004b). Zu den bekanntesten Surrogat-Substraten zählen etwa *p*-Nitrophenyl (*p*NP)-Verbindungen für Hydrolasen. Für die Synthese eines solchen Substrates wird *p*NP mit einem Produkt der durch das Enzym katalysierten Reaktion verestert. Am Beispiel der Lipase A (LipA) aus *B. subtilis* wäre ein geeignetes Surrogat-Substrat etwa *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP), welches durch die Veresterung von *p*NP mit Palmitinsäure entsteht (Abb. 1.4; Skoczinski et al., 2017, Winkler et al., 1979).

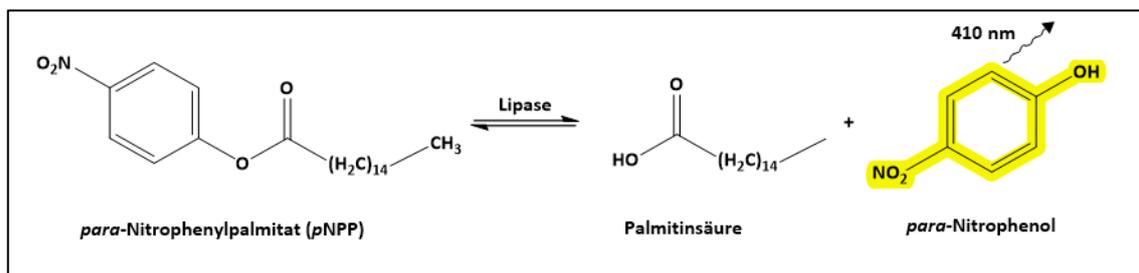


Abb. 1.4: Aktivitätsbasierter Nachweis von Lipasen mit *para*-Nitrophenylpalmitat nach Winkler et al., 1979. Das Edukt *p*NPP wird bei der durch die Lipase vermittelten Reaktion hydrolysiert, wodurch Palmitinsäure und *para*-Nitrophenol als Produkte entstehen. Letzteres emittiert in basischer Lösung Licht der Wellenlänge von 410 nm und kann photometrisch detektiert werden.

Die Messung wird durch das Zusammenführen einer Substratlösung und in diesem Fall der LipA gestartet. Während der enzymatischen Reaktion wird die Esterbindung des *p*NPP hydrolysiert, wobei die Produkte Palmitinsäure und *para*-Nitrophenolat entstehen. In basischer Lösung emittiert *para*-Nitrophenolat Licht mit einer Wellenlänge von 410 nm, welches photometrisch ausgelesen werden kann (Winkler et al., 1979). Mit Substraten auf *p*NP-Basis können die Aktivitäten vieler unterschiedlicher Hydrolasen wie Phosphatasen, β -Glukuronidasen, Lipasen, PETasen und Proteasen bestimmt werden (Winkler et al., 1979, Lorenz, 2011, Cui et al., 2016, Bååth et al., 2020, Stavrakoudis et al., 1997). Neben den *p*NP-basierten Aktivitätsassays gibt es noch viele weitere Substrate wie Azocasein für Proteasen oder chromogenes Polysaccharid-

Hydrogel für biomasseabbauende Enzyme, die für Aktivitätsmessungen genutzt werden können (Kračun et al., 2015, Kasana et al., 2011). Neben den direkten Aktivitätsmessungen gibt es noch die indirekten Messungen, bei denen eine einfach zu messende Indikatorreaktion an die zu untersuchende enzymatische Reaktion gekoppelt wird. Oft werden dafür NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen genutzt, die das Produkt oder ein darauf aufbauendes Stoffwechselintermediat der zu untersuchenden Reaktion oxidieren und NAD(P)⁺ daraufhin reduzieren, da die Zunahme von NAD(P)H bei 340 nm ausgelesen werden kann (Bisswanger, 2014, Kaltwasser et al., 1966). Der Nachteil an aktivitätsbasierten Nachweismethoden ist, dass zunächst, bevor die Methode im Hochdurchsatz genutzt werden kann, für jedes Zielenzym spezifische Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur, Pufferzusammensetzung oder Substratkonzentration gefunden werden müssen (Bisswanger, 2014).

1.4.2 Fluoreszenzbasierte Detektionsmethoden

Mit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria* im Jahre 1962 und der Feststellung, dass dieses rekombinant in verschiedenen eukaryotischen und prokaryotischen Organismen produziert und als Reporter genutzt werden kann, begann die Ära der Fluoreszenzreporter (Shimomura et al., 1962, Chalfie et al., 1994). GFP ist ein etwa 27 kDa großes Protein, welches aus elf β -Faltblättern besteht und eine β -Fasstruktur einnimmt (Ormö et al., 1996). Im Inneren dieses Fasses befindet sich der für die Fluoreszenz benötigte Chromophor. Dieser wird autokatalytisch unter aeroben und basischen Bedingungen aus den drei Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67 gebildet (Heim et al., 1994, Cody et al., 1993). Seit der Entdeckung des GFP konnten über Mutagenese die verschiedensten Derivate hinsichtlich der Fluoreszenzeigenschaften oder anderer Proteincharakteristika konstruiert werden (Lambert, 2019). Das für diese Arbeit wichtigste Anwendungsgebiet von Fluoreszenzreportern ist die Nutzung in fluoreszenzbasierten Detektionsmethoden. Dabei wird unabhängig von ihrer Anwendungsweise die Produktion des zu messenden Zielproteins mit der Produktion eines Fluoreszenzproteins gekoppelt. Dieses kann anschließend über seine Fluoreszenz ausgelesen werden und gibt Aufschluss über die Menge des Zielproteins (Schallmey et al., 2014, van Rossum et al., 2013). Fluoreszenzbasierte Biosensoren können auf unterschiedliche Weisen konstruiert werden, wobei die bekanntesten die fusionsbasierten, die RNA-basierten und die transkriptionsfaktorbasierten Biosensoren sind (Abb. 1.5; Schallmey et al., 2014, van Rossum et al., 2013).

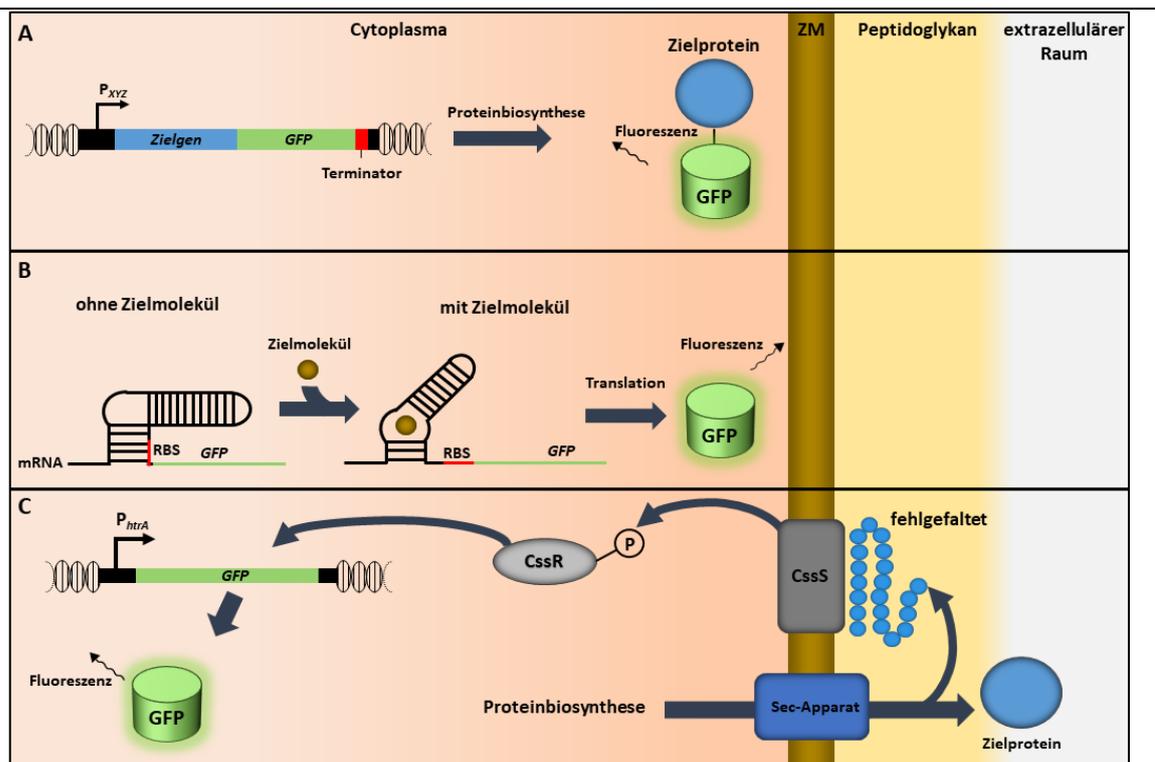


Abb. 1.5: Prinzip von fluoreszenzbasierten Biosensoren. Fluoreszenzbasierte Biosensoren können auf unterschiedliche Weisen konstruiert werden. **A** Bei einem fusionsbasierten Biosensor werden Zielprotein und Fluoreszenzreporter translational fusioniert. Dadurch wird immer ein fluoreszierendes Fusionsprotein produziert, dessen Produktion über die Fluoreszenz detektiert werden kann. **B** Bei RNA-basierten Biosensoren werden Riboschalter genutzt. Riboschalter sind *cis*-Kontrollelemente der mRNA, die aus RNA-Sekundär- und -Tertiärstrukturen und einer sogenannten Adapter-Domäne bestehen. Erst durch die Bindung eines Liganden kann der Fluoreszenzreporter gebildet werden. Liganden sind in solchen Fällen meist Zielmoleküle, die direkt oder indirekt von dem nachzuweisenden Zielprotein abhängig sind. In dem hier gezeigten Fall maskiert der Riboschalter in Abwesenheit des Liganden die RBS. Durch die Bindung des Liganden in der Adapter-Domäne geht der Riboschalter eine Konformationsänderung ein, welche die RBS für Ribosomen zugänglich macht, wodurch das stromabwärts liegende *GFP* translatiert werden kann. **C** Bei den transkriptionsfaktor-basierten Biosensoren wird die Expression des Fluoreszenzreportergens unter die Kontrolle eines wirtsspezifischen Promotors gestellt. Die Expression wird anschließend über ein spezifisches zelluläres Signal induziert, was wiederum durch die Reporterfluoreszenz ausgelesen werden kann. Hier ist der Sekretionsstress-Biosensor aus *B. subtilis* dargestellt. Bei diesem wurde das Reportergen genomisch unter Kontrolle des P_{htrA} Promotors integriert. Sobald fehlgefaltetes sekretiertes Zielprotein am Übergang zwischen der Zellmembran (ZM) und dem Peptidoglykan vom Sensor *CssS* erkannt wird, phosphoryliert dieser den Regulator *CssR*, welcher anschließend an die Promotorregion des P_{htrA} Promotors binden kann und die *GFP* Transkription initiiert.

Bei der fusionsbasierten Nachweismethode werden Zielprotein und Fluoreszenzreporter molekular fusioniert (Abb. 1.5A). Diese Anwendung ist in ihrer Konstruktion die wohl einfachste Detektionsmethode, dabei kann die Zielproteinmenge direkt über die Fluoreszenz des Fusionsproteins ausgelesen werden. Nachteilig an dieser simplen Anwendungsweise ist, dass durch die Fusion von zwei Proteinen die Ausbeute, Stabilität und auch Aktivität des Zielproteins beeinträchtigt werden kann (Waldo et al., 1999, van Rossum et al., 2013). Bei den zwei anderen fluoreszenzbasierten Detektionsmethoden wird die Möglichkeit der Zielproteinbeeinträchtigung durch das Messsystem umgangen. Dafür wird sowohl bei den RNA-basierten als auch bei den transkriptionsfaktor-basierten Biosensoren die Messung des Zielproteins nur indirekt mit der

Reporterproduktion gekoppelt. Bei RNA-basierten Detektionssystemen macht man sich sogenannte Riboschalter zu Nutze. Riboschalter sind *cis*-Kontrollelemente der mRNA, die aus RNA-Sekundär- und -Tertiärstrukturen bestehen. Diese können verschiedene Schritte der Genexpression über ihre Konformation regulieren. Für die Konformationsänderungen verfügen Riboschalter über Adapter-Domänen, die spezifische Liganden erkennen und binden. Eine der bekanntesten durch Riboschalter regulierten Schritte ist die Translationsinitiation. Die RBS ist in der ungebundenen Konformation maskiert und wird erst für die Ribosomen zugänglich, nachdem der Ligand gebunden ist (Winkler et al., 2005, Serganov et al., 2013). Bei der Nutzung als Nachweismethode wird ein nativer oder *de novo* synthetisierter Riboschalter genutzt, dessen Adapter-Domäne ein Zielmolekül erkennen kann und daraufhin die Synthese eines Fluoreszenzreporters auslöst (Abb. 1.5B; Schallmey et al., 2014, van Rossum et al., 2013). Bei den transkriptionsfaktorbasierten Biosensoren wird die Reporterexpression unter Kontrolle eines wirtsspezifischen Promotors gestellt, welcher bei spezifischen zellulären Signalen die Expression induziert. Oft sind diese Signale Produkte der durch das Zielenzym katalysierten Reaktion wie beispielsweise beim Metagenom-Screening nach Lactam-produzierenden Enzymen oder spezifische Eigenschaften des Zielproteins (Abb. 1.5C; Yeom et al., 2018, Schallmey et al., 2014). Die meisten fluoreszenzbasierten Nachweismethoden sind darauf ausgelegt intrazelluläre Zielproteine zu quantifizieren. Einer der wenigen Biosensoren für sekretierte Proteine ist der Sekretionsstress-Biosensor. Bei diesem transkriptionsfaktorbasierten Biosensor wird ein Fluoreszenzreportergen genomisch unter Kontrolle des P_{htrA} Promotors integriert. Bei anschließendem Aufkommen von Sekretionsstress (Kapitel 1.3.2.2) wird das Fluoreszenzprotein produziert und macht damit die zelluläre Stressantwort auf die (rekombinante) Proteinsekretion quantifizierbar. Dies kann zumindest indirekt eine Auskunft über die Sekretion geben (Trip et al., 2011, Jurischka et al., 2020). Fluoreszenzbasierte Detektionsmethoden stellen durch ihre simple Durchführbarkeit eine Alternative zu den zuvor genannten Aktivitätsassays dar. Zusätzlich können mit solchen Methoden auch schwer messbare Enzyme und nicht enzymatische Proteine nachgewiesen werden. Neben der reinen Zielproteinquantifizierung in Zellsuspensionen, können die Fluoreszenzsignale auch für Einzelzellanalysen hinsichtlich Populationsheterogenität oder in Kombination mit der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) für die Messung von sehr großen Screening-Kampagnen mit bis zu 10^9 verschiedenen Varianten genutzt werden (van Rossum et al., 2013, Schallmey et al., 2014, Tracy et al., 2010).

1.4.2.1 Split GFP Assay

Der Split GFP Assay ist eine Sonderform der fusionsbasierten Biosensoren und beruht auf der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC, Abb. 1.6A).

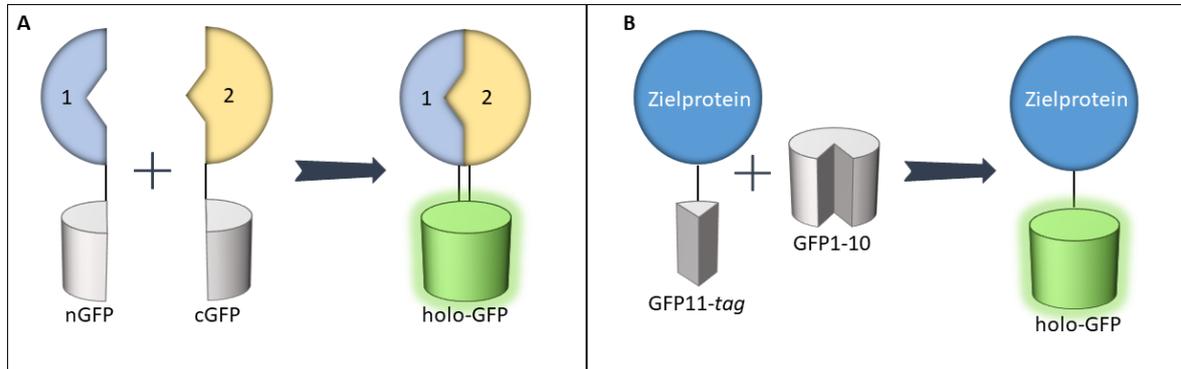


Abb. 1.6: Die Prinzipien der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation und des darauf basierenden Split GFP Assays. **A** Bei BiFC-Experimenten wird der Fluoreszenzreporter in ein N-terminales (nGFP) und ein C-terminales (cGFP) Fragment aufgetrennt. Die Fragmente werden für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen an die zwei zu untersuchenden Proteine (1 und 2) fusioniert. Gehen beide Proteine eine Interaktion ein, befinden sich die GFP-Fragmente in räumlicher Nähe und können zu einem fluoreszierenden holo-GFP rekonstituieren. **B** Bei der Split GFP Technologie wird nur das elfte β -Faltblatt des GFP an das zu detektierende Zielprotein fusioniert (GFP11-tag). Für die anschließende Detektion wird ein trunkiertes, nicht fluoreszierendes GFP (GFP1-10), dem das elfte β -Faltblatt fehlt, dem markierten Zielprotein zugeführt. Daraufhin können beide GFP-Fragmente assemblieren und ein fluoreszierendes holo-GFP bilden, dessen Fluoreszenz die Zielproteinmenge quantifizierbar macht.

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation wurde ursprünglich zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen in der Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Dafür wird das Fluoreszenzprotein molekularbiologisch in zwei nicht fluoreszierende Fragmente aufgetrennt. Diese Fragmente werden an die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Bei einer möglichen Interaktion der zu untersuchenden Proteine befinden sich die Fragmente in räumlicher Nähe und können zu einem holo-Fluoreszenzprotein rekonstituieren, dessen Fluoreszenz spektrometrisch ausgelesen werden kann (Hu et al., 2002). Beim Split GFP Assay wird nur das elfte β -Faltblatt mit einem kurzen Peptidlinker an das Zielprotein fusioniert (GFP11-tag, Abb. 1.6B). Für die Detektion wird ein trunkiertes GFP (GFP1-10 oder Detektor), welchem das elfte β -Faltblatt fehlt, genutzt (Cabantous et al., 2004). Der Vorteil im Vergleich zur GFP-Fusion ist, dass der kurze Peptid-tag nur einen minimalen Einfluss auf das Zielprotein hat (Knapp et al., 2017, Bakkes et al., 2021). Entwickelt wurde der Split GFP Assay zunächst als *in vivo* Methode zur Untersuchung der Zielproteinlöslichkeit in *E. coli* durch die Koproduktion von Zielprotein und GFP1-10 (Cabantous et al., 2006, Cabantous et al., 2004). Darauf aufbauend konnte der Split GFP Assay als *in vitro* Detektionsmethode für intrazelluläre Proteine in *E. coli* und für sekretierte Proteine in *B. subtilis* und *C. glutamicum* etabliert werden (Santos-Aberturas et al., 2015, Bakkes et al., 2021, Knapp et al., 2017).

1.5 Zielsetzung

Das Gram-positive Bakterium *B. subtilis* ist einer der meistverwendeten Mikroorganismen in der industriellen Biotechnologie. Um die bakterielle Produktion von rekombinanten Proteinen für industrielle Anwendungen effizient und wirtschaftlich zu machen, muss der Produktionsprozess für das jeweilige Zielprotein optimiert werden. Dabei können verschiedene bakterielle Prozesse wie die Transkription, Translation oder Sekretion verbessert und im Idealfall aufeinander abgestimmt werden. Dies kann durch die Kombination verschiedener ungerichteter oder gerichteter Optimierungskampagnen erreicht werden wie etwa dem Signalpeptid-Screening im Falle der Sekretionsoptimierung. Da bei solchen Kampagnen jedoch oft mehrere Hundert oder gar Tausend Varianten getestet werden, muss eine verbesserte Produktion und/oder Sekretion des Zielproteins für ein sogenanntes Hochdurchsatz-Screening einfach nachweisbar und quantifizierbar sein. Dies erfolgt häufig über die enzymatische Umsetzung von Surrogat-Substraten, deren Reaktionsprodukte photo- oder fluorimetrisch nachweisbar sind. Da nicht für alle Zielproteine solche Substrate und Aktivitätsassays zur Verfügung stehen und diese auch meist nicht für die *in vivo* Detektion nutzbar sind, werden immer öfter fluoreszenzbasierte Biosensoren genutzt, bei denen die Proteinsynthese durch die Kopplung mit der Produktion von Fluoreszenzreporterproteinen *in vivo* über die Fluoreszenz ausgelesen werden kann.

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, neue fluoreszenzbasierte Biosensoren zu erzeugen und für die Optimierung der Produktion und Sekretion von Proteinen in *B. subtilis* am Beispiel variierender Translationsraten und verschiedener Signalpeptide zu evaluieren. Dafür sollten sowohl Split GFP- als auch transkriptionsfaktorabhängige Sensoren entwickelt und eingesetzt werden. Der Split GFP Assay ermöglicht eine simple Detektion von Zielproteinen, an die das elfte β -Faltblatt des GFP fusioniert wurde (GFP11-*tag*). Für die Detektion wird ein nicht fluoreszierendes trunkiertes GFP genutzt, dem das elfte β -Faltblatt fehlt (GFP1-10 oder Detektor genannt). Kommen beide GFP-Fragmente in Kontakt können diese zu einem holo-GFP rekonstituieren, dessen Fluoreszenzsignal quantifiziert werden kann. Solche Split GFP-basierten Sensoren sollten (I) für den *in vivo* Nachweis intrazellulärer Zielproteine am Beispiel der β -Glukuronidase aus *E. coli* entwickelt und evaluiert werden. Zusätzlich sollte (II) ein analoges Sekretionsnachweissystem etabliert werden. Im Gegensatz zu den Split GFP-Sensoren beruhen (III) transkriptionsfaktorabhängige Nachweissysteme darauf, dass die Expression eines Fluoreszenzreportergens unter die Kontrolle eines wirtsspezifischen Promotors gestellt wird. Dadurch kann die Expression des Reporters in Abhängigkeit eines spezifischen zellulären Signals induziert und somit über das daraus resultierende Fluoreszenzsignal analysiert werden.

Um die Proteinsekretion eines Zielproteins in *B. subtilis* weiter optimieren zu können, sollte mit dieser Strategie ein Sekretionsstress-Biosensor basierend auf dem CssRS Zweikomponentenqualitätskontrollsystem etabliert werden. Mithilfe dieses Sensors sollte untersucht werden, ob zellulärer Sekretionsstress, welcher durch die Akkumulation von nach der Sekretion fehlgefaltetem Protein am Übergang zwischen der Zellmembran und dem Peptidoglykan zustande kommt, während der Bakterienkultivierung nachgewiesen werden kann. Für die Etablierung beider Sekretionssensoren sollte die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* als Modellenzym verwendet werden. Abschließend sollten die in (I), (II) und (III) entwickelten Methoden zu einem Drei-Sensor-System kombiniert werden. Ein solches System könnte durch die simultane Bestimmung von intrazellulärem sowie erfolgreich sekretiertem bzw. nach der Sekretion an der Zellmembran akkumuliertem Zielprotein eine umfassende Sekretionsanalyse in lebenden Zellen ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und anderen Reagenzien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland). Enzyme wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) oder New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Bakterienstämme (Tab. 2.1) und Plasmide (Tab. 2.2) verwendet.

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U196 (ϕ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Woodcock et al., 1989
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F' ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (λ <i>ts875 ind1 Sam7 nin5 lavUV5-</i> <i>T7gene1</i>)	Studier et al., 1986
<i>B. subtilis</i> DB430	<i>trpC2 his nprE aprE bpf ispl</i>	He et al., 1991
<i>B. subtilis</i> PAL2	<i>trpC2 his nprE aprE bpf ispl</i> <i>htrA::P_{HpaII}-GFP</i>	Diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> PAL3	<i>trpC2 his nprE aprE bpf ispl</i> <i>htrA::GFP</i>	Diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> PAL4	<i>trpC2 his nprE aprE bpf ispl</i> <i>htrA::P_{htrA}-GFP</i>	Diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> PAL5	<i>trpC2 his nprE aprE bpf ispl</i> <i>htrA::P_{htrA}-mCherry</i>	Diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> WB800N	<i>trpC2 nprE aprE epr bpr mpr::ble</i> <i>nprB::bsr vpr wprA::hyg</i> <i>ispA::Km^R</i>	Nguyen et al., 2011

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pBSMul1	Shuttlevektor für <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i> , P _{HpaII} , RBS, 4 nt langer Spacer 5'-ACAT-3' zwischen RBS und Startcodon, SP _{ijpA} , C- terminaler His ₆ -tag, <i>colE1</i> , <i>repB</i> , <i>Km^r</i> , <i>Amp^r</i>	Brockmeier et al., 2006b
pBSMul1-gfpmut3	pBSMul1 mit 731 bp PaeI-XhoI Fragment von <i>gfpmut3</i> unter Kontrolle des P _{HpaII}	Volkenborn et al., 2020
pBS-4nt-GUS	pBSMul1 mit 1828 bp NdeI-XbaI Fragment von <i>uidA</i> (<i>E. coli</i> ; kodierend für die β - Glukuronidase)	Volkenborn et al., 2020

Plasmid	Genotyp	Referenz
pBS-Xnt-GUS	pBS-4nt-GUS mit einem durch die Insertion von 1-8 Adenin(en) am 5'-Ende verlängerten Spacer von 4 bis 12 nt	Volkenborn et al., 2020
pBS-Xnt-GUS11	pBS-Xnt-GUS mit Fusion der Sequenz des elften β -Faltblatts des GFP am 3'-Ende der <i>gus</i>	Lenz et al., 2021
pBS-4nt-SP _{Epr} -Cut11	pBSMul1 mit 845 bp NdeI-XbaI Fragment von <i>SP_{Epr}-cut-GFP11</i>	Volkenborn et al., 2020
pBS-Xnt-SP _{Epr} -Cut11	pBS-4nt-SP _{Epr} -Cut11 mit einem durch die Insertion von 1-8 Adenin(en) am 5'-Ende verlängerten Spacer von 4 bis 12 nt	Volkenborn et al., 2020
pBS-4nt-SP _{Pel} -Cut11	pBSMul1 mit 827 bp NdeI-XbaI Fragment von <i>SP_{Pel}-cut-GFP11</i>	Volkenborn et al., 2020
pBS-Xnt-SP _{Pel} -Cut11	pBS-4nt-SP _{Pel} -Cut11 mit einem durch die Insertion von 1-8 Adenin(en) am 5'-Ende verlängerten Spacer von 4 bis 12 nt	Volkenborn et al., 2020
pBS-4nt-SP _{Bsn} -Cut11	pBSMul1 mit 848 bp NdeI-XbaI Fragment von <i>SP_{Bsn}-cut-GFP11</i>	Volkenborn et al., 2020
pBS-Xnt-SP _{Bsn} -Cut11	pBS-4nt-SP _{Bsn} -Cut11 mit einem durch die Insertion von 1-8 Adenin(en) am 5'-Ende verlängerten RBS-Spacer von 4 bis 12 nt	Volkenborn et al., 2020
pBSMul1-SPMix-SP _{NprE} -EXLX1-GFP11	pBSMul1(SPBox)-Variante mit SP _{NprE} und 726 bp EcoRI-XbaI Fragment von <i>exlx1-GFP11</i>	Volkenborn, unveröffentlicht
pBSMul1-SPMix-SP _{NprE} -Cut11	pBSMul1(SPBox)-Variante mit SP _{NprE} und 657 bp EcoRI-XbaI Fragment von <i>cut-GFP11</i>	Diese Arbeit
pBS-4nt-SP _{NprE} -Cut11	pBSMul1 mit 744 bp NdeI-XbaI Fragment von <i>SP_{NprE}-cut-GFP11</i>	Diese Arbeit
pBS-Xnt-SP _{NprE} -Cut11	pBS-4nt-SP _{NprE} -Cut11 mit einem durch die Insertion von 1-8 Adenin(en) am 5'-Ende verlängerten Spacer von 4 bis 12 nt	Diese Arbeit
pET22b	<i>ColE1 PT7Φ10laclq</i> , Amp ^R	EMD Millipore
pET22b-sfGFP1-10	pET22b(+) mit <i>sfGFP1-10</i>	Knapp et al., 2017
pET22b-YFP1-10	pET22b-sfGFP1-10 mit einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Lysin an Position 69 und einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Tyrosin an Position 203	Knapp, unveröffentlicht
pET22b-CFP1-10	pET22b-sfGFP1-10 mit einem Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Tryptophan an Position 66	Knapp, unveröffentlicht

Plasmid	Genotyp	Referenz
pHT01	Shuttlevektor für <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i> , P_{grac} , RBS, C-terminaler His ₆ -tag, <i>colE1</i> , <i>repA</i> , <i>lacI</i> , Amp^R , Cm^R	Nguyen et al., 2007
pHT01-sfGFP1-11	pHT01 mit 717 bp <i>sfGFP</i>	Hogenkamp et al., 2020
pHT01-GFP1-10	pHT01 mit 645 bp <i>GFP1-10</i> ,	Lenz et al., 2021
pHT01-iSplitGFP	pHT01-sfGFP1-11 mit einem Basenaustausch an Positionen 643-645 von 5'-CGT-3' in 5'-TGA-3' zum Einbringen eines Stoppcodons	Lenz et al., 2021
pHT01-YFP	pHT01-sfGFP1-11 mit einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Lysin an Position 69 und einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Tyrosin an Position 203	Diese Arbeit
pHT01-CFP	pHT01-sfGFP1-11 mit einem Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Tryptophan an Position 66	Diese Arbeit
pHT01-P4	pHT01-sfGFP1-11 mit einem Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Histidin an Position 66	Diese Arbeit
pHT01-mCherry	pHT01-sfGFP1-11, bei dem <i>sfGFP</i> mit 711 bp <i>mCherry</i> ersetzt wurde	Diese Arbeit
pHT01-iSplitYFP	pHT01-YFP1-11 mit einem Basenaustausch an Positionen 643-645 von 5'-CGT-3' in 5'-TGA-3' zum Einbringen eines Stoppcodons	Diese Arbeit
pHT01-iSplitCFP	pHT01-CFP1-11 mit einem Basenaustausch an Positionen 643-645 von 5'-CGT-3' zu 5'-TGA-3' zum Einbringen eines Stoppcodons	Diese Arbeit
pHT01-iSplitP4	pHT01-P4-1-11 mit einem Basenaustausch an Positionen 643-645 von 5'-CGT-3' zu 5'-TGA-3' zum Einbringen eines Stoppcodons	Diese Arbeit
pBSMul1(SPBox)-LipA	pBSMul1-Bank mit 173 homologen Signalsequenzen und 568 bp EcoRI-XbaI Fragment von <i>lipA</i>	Brockmeier et al., 2006a
pBSMul1(SPBox)-Cut11	pBSMul1-Bank mit 173 homologen Signalsequenzen und 642 bp EcoRI-XbaI Fragment von <i>cut</i> und <i>GFP11</i>	Diese Arbeit
pBSMul1(SPBox)-SP _{DacB} -Cut11	pBSMul1(SPBox)-Variante mit SP _{DacB} und 657 bp EcoRI-XbaI Fragment von <i>cut-GFP11</i>	Diese Arbeit
pBSMul1(SPBox)-SP _{YbcC} -Cut11	pBSMul1(SPBox)-Variante mit SP _{YbcC} und 657 bp EcoRI-XbaI Fragment von <i>cut-GFP11</i>	Diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
pBSMul1(SPBox)-SP _{Ybbc} -Cut11*	pBSMul1(SPBox)-Variante mit SP _{Ybbc} und 657 bp EcoRI-XbaI Fragment von <i>cut-GFP11</i> . Zusätzlich Aminosäureaustausch A252S im GFP11- <i>tag</i> .	Diese Arbeit
pBSMul1(SPBox)-SP _{Mpr} -Cut11	pBSMul1(SPBox)-Variante mit SP _{Mpr} und 657 bp EcoRI-XbaI Fragment von <i>cut-GFP11</i>	Diese Arbeit
pJOE8999-1	Shuttlevektor für <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i> , <i>pUCori</i> , <i>rep pE194ts</i> , <i>cas9</i> , <i>Km^R</i> , <i>sgRNA</i> , <i>lacPOZ</i>	Altenbuchner, 2016
pJOE-sgRNA:htrA	pJOE8999-1 mit inserierter sgRNA für den <i>htrA</i> Locus (5'-TACATCCGTGAGGTCGCTTC-3') zwischen den BsaI-Schnittstellen	Diese Arbeit
pJOE-sgRNA:htrA-H1H2	pJOE-sgRNA:htrA mit 3300 bp SfiI-SfiI <i>proG-htrA-ykcC</i> Fragment bestehend aus dem für die homologe Rekombination benötigten Bereich stromaufwärts von <i>htrA</i> , <i>htrA</i> und dem für die homologe Rekombination benötigten Bereich stromabwärts von <i>htrA</i> .	Diese Arbeit
pJOE-sgRNA:htrA-htrA::Phpall-GFP	pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrA-GFP mit mittels SLIC zwischen <i>proG</i> und <i>sfGFP</i> eingefügten 280 bp P _{HpaII}	Diese Arbeit
pJOE-sgRNA:htrA-htrA::GFP	pJOE-sgRNA:htrA-H1H2 mit mittels SLIC zwischen <i>proG</i> und <i>ykcC</i> eingefügten 736 bp <i>sfGFP</i> .	Diese Arbeit
pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrA _{full} -GFP	pJOE-sgRNA:htrA-H1H2 mit mittels SLIC zwischen <i>proG-P_{htrA}</i> und <i>ykcC</i> eingefügtem 744 bp <i>sfGFP</i>	Diese Arbeit
pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrA-mCherry	pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrA _{full} -GFP mit durch SLIC ausgetauschtem <i>sfGFP</i> mit <i>mCherry</i>	Diese Arbeit
pBSMul1-wtXynA-GFP11	pBSMul1 mit 741 bp NdeI-XbaI-Fragment aus <i>xynA</i> und <i>GFP11</i>	Volkenborn, unveröffentlicht
pBSMul1-wtEXLX1-GFP11	pBSMul1 mit 807 bp NdeI-XbaI-Fragment aus <i>exlX1</i> und <i>GFP11</i>	Volkenborn, unveröffentlicht
pJT ^{Tmcs} -mCherry	<i>Amp^R</i> , <i>Gm^R</i> , P _{tacl} RBS, <i>mCherry</i>	Burmeister et al., 2019

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Tab. 2.3) wurden von der Firma MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Die Oligonukleotide wurden mit dH₂O auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Für die Nutzung in PCR-Ansätzen wurde die Lösung noch zehnfach verdünnt. Die Oligonukleotide wurden bei -20°C gelagert.

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide. Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen oder komplementäre Bereiche für SLIC sind hervorgehoben, durch Primer eingefügte Mutationen sind unterstrichen.

Name	Sequenz [5'-3']	Eigenschaften
pBSMul-for	GGAGCGATTTACATAATAAGGAGGA CATATG	Amplifikation von Genen, welche auf dem pBSMul1 kodiert sind. Fügt am 5'-Ende des Gens eine NdeI-Schnittstelle ein.
GUS-rev-fu1	TGATCACGAGATGTAGAGCCGCCGC CAGAGCCGCCATCAGAGCCGATAAG TTGTTTGCTCCCTGCTGCGTTTTTC	Fügt die erste Hälfte des GFP11-tags ein.
Rev-fu2	TATATCTAGATTATGTGATGCCAGCA GCGTTAACGTATT	Fügt die zweite Hälfte des GFP11-tags ein. Zusätzlich wird eine XbaI-Schnittstelle am 3'-Ende des Gens eingefügt.
1f-i-pET22b-s-o(Vec)	GGATAACAATTCCCAATTAAGGAG GAGATATACATATGAGCAAAGGAGA AGA	Amplifikation von <i>sfGFP</i> für das Einfügen in den pHT01 mittels SLIC.
1r-i-pET22b-s-o(Vec)	GTATCCTCTAAGTAATATGAATCCC TTCCAGCCGGATCTCAGTGGT	
Vf-pHT01	GAAGGGAATTCATATTACTTAGAGG ATACT	Amplifikation des pHT01 Vektors für das Einfügen von <i>sfGFP</i> mittels SLIC.
Vr-pHT01	CCTCCTTAATTGGGAATTGTATCC G	
QC-fw-GFPR215STOP	GATCCCAACGAAAAGT <u>G</u> AGACCACA TGGTCCTTC	Austausch von Arginin an Position 215 zu einem Stoppcodon in <i>sfGFP</i> oder einem der <i>sfGFP</i> -Derivate.
QC-rev-GFPR215STOP	GAAGGACCATGTGGT <u>C</u> ACTTTTCG TTGGGATC	
htrA-sgRNA1	AAACGAAGCGACCTCACGGATGTA	Bilden bei der Hybridisierung die <i>Spacer</i> -Sequenz für die Integration in den
htrA-sgRNA2	TACGTACATCCGTGAGGTCGCTTC	
fw-htrA-H1	TATAGGGTCGAC GGCCAACGAGGCC GAATCCTCTTTCAAGGATTC	Amplifikation von <i>proG-htrA-ykcC</i> mit SfiI-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende.
Rev-htrA-H2	CTTAATCTAGAAA GGCCTTATTGGCC CTGATGAAAGGCTCGCCGGAG	
Rev-SLIC-PhtrAfull	CATGAATTCGATATCAAGC TTATCCA TCATGTTCACTCC	Amplifikation des pJOE-sgRNA:htrA-H1H2 ohne <i>htrA</i> für die Integration von <i>sfGFP/mCherry</i> zwischen <i>proG</i> und <i>ykcC</i> mittels SLIC.
Fw-htrA-H2	GATGAGCTCTACAAATGACCTAGTG TAGGGACATAATGCCTCAGGCC	
Fw-SLIC-sfGFP	GCTTGATATCGAATTCATGAGCAAA GGAGAAGAAC	Amplifikation von <i>sfGFP</i> für die Integration in pJOE-sgRNA:htrA-H1H2 mittels SLIC zwischen <i>proG</i> und <i>ykcC</i> .
Rev-XagI-GFP	CCTACACTAGGTCATTTGTAGAGCTC ATC	<i>Reverse</i> Primer für die Amplifikation von <i>sfGFP</i> zur Integration in pJOE-sgRNA:htrA-H1H2 zwischen <i>proG</i> und <i>ykcC</i> .
Fw-GFP-ohnePromotor	GCGGCCGCATGAGCAAAGGAGAAG AAC	<i>Forward</i> Primer für die Amplifikation von <i>sfGFP</i> zur Integration in pJOE-sgRNA:htrA-H1H2 zwischen <i>proG</i> und <i>ykcC</i> ohne Promotor.
Rev-htrA-H1ohneP	GTTCTTCTCCTTTGCTCATGCGGCCG CATGGAACAGATTGGATTGATTGG	<i>Reverse</i> Primer zur Amplifikation von pJOE-sgRNA:htrA-H1H2 ohne <i>P_{htrA}</i> Promotor.
SLIC-fw-Phpall	ATCCAATCTGTTCCATCCCGGGAGG TGGCAGAGGGCAGG	Amplifikation vom <i>P_{HpaII}</i> Promotor mit komplementären Überhängen zum Austausch von
SLIC-rev-Phpall	GTTCTTCTCCTTTGCTCATGCGGCCG CTCCTCCTTAAGCTTATTATG	<i>P_{htrA}</i> mit <i>P_{HpaII}</i> in pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrA _{full} -GFP.

Name	Sequenz [5'-3']	Eigenschaften
SLIC-fw-pJOE-Phpall	CATAATAAGCTTAAGGAGGAGCGG CCGCATGAGCAAAGGAGAAGAAC	Amplifikation vom pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrA _{full} -GFP mit komplementären Überhängen zum Austausch vom <i>P_{htrA}</i> Promotor mit dem <i>P_{HpaII}</i> Promotor mittels SLIC.
SLIC-rev-pJOE-Phpall	GCCCTCTGCCACCTCCCGGGATGGA ACAGATTGGAT	
Fw-SLIC-mCherry	ATAAGCTTGATATCGAATTCATGGT GAGCAAGGGCGAG	Amplifikation von <i>mCherry</i> für die Integration in pJOE-sgRNA:htrA-H1H2 mittels SLIC zwischen <i>proG</i> und <i>ykcC</i> .
Rev-SLIC-mCherry	GGTCATTTGTAGAGCTCATCTTACTT GTACAGCTCGTC	
Fw-NdeI-SPNprE	GACATATGGGTTTAgGTAAGAAAT TG	Amplifikation von <i>SP_{NprE}-cut11</i> aus pBSM _{ul1} (SPBox)-SP _{NprE} -Cut11 mit NdeI-Schnittstelle am 5'-Ende und XbaI-Schnittstelle am 3'-Ende.
Rev-GFP11-XbaI	ATCTCTAGATTATGTGATGCCAGCAG CG	
QC-fw-Y66W	CTTGTCCTACTCTGACCTGGGGTGT TCAATGCTTTTCC	Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Tryptophan an der Position 66 in <i>sfGFP</i> oder Derivaten.
QV-rev-Y66W	GGAAAAGCATTGAACACCCAGGTC AGAGTAGTGACAAG	
QC-fw-Q69K	ACTCTGACCTATGGTGTTAAATGCTT TTCCCGTTATCCG	Aminosäureaustausch von Glutamin zu Lysin an der Position 69 in <i>sfGFP</i> oder Derivaten.
QC-rev-Q69K	CGGATAACGGGAAAAGCA TTT AACA CCATAGGTCAGAGT	
QC-fw-T203Y	GACAACCATTACCTGTGCTATCAAAC GGTCCTTTCCGAAAG	Aminosäureaustausch von Threonin zu Tyrosin an der Position 203 in <i>sfGFP</i> oder Derivaten.
QC-rev-T203Y	CTTTCGAAAAGGACCGTTT GAT CGAC AGGTAATGGTTGTC	
QC-fw-Y66H-P4	CACTTGTCCTACTCTGACCCATGGT GTTCAATGCTTTTCCCG	Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Histidin an Position 66 in <i>sfGFP</i> oder Derivaten.
QC-rev-Y66H-P4	CGGGAAAAGCATTGAACACCCATGGG TCAGAGTAGTGACAAGTG	

2.4 Arbeiten mit Bakterien

2.4.1 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden nach der Herstellung im Autoklaven sterilisiert (121°C, 20 min, 200 kPa). Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika oder IPTG wurden sterilfiltriert (Roth-Membranfilter, 0,22 µm Porendurchmesser) und dem sterilen Medium zugesetzt.

LB-Medium: (*Lysogeny-broth*-Medium, Sambrook et al., 1989): 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl. Zur Herstellung von LB-Agar wurde 15 g/L Agar hinzugegeben.

optimiertes LB-Medium (oLB-Medium, Lenz et al., 2021): 40 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl.

2.4.2 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium (Kapitel 2.4.1) bei 37°C und 130 Umdrehungen pro Minute (UpM) kultiviert. Zur stabilen Replikation der Plasmide wurde das LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Tab. 2.2; Tab. 2.4).

2.4.3 Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (modifiziert nach Hanahan, 1983) wurden 10 ml LB-Medium mit einem *E. coli*-Einzelklon inokuliert und über Nacht bei 37°C und 130 UpM inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium auf eine OD_{580nm} von 0,05 inokuliert und bis zum Erreichen einer OD_{580nm} von 0,5 bei 37°C und 130 UpM kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis gelagert, bevor sie für 10 min bei 2.790g und 4°C zentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde in 35 ml eiskaltem FB-Puffer (100 mM KCl, 50 mM CaCl₂, 10 % (w/v) Glycerin und 10 mM Kaliumacetat, pH 6,4) resuspendiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde erneut für 10 min bei 2.790g und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 8,5 ml eiskaltem FB-Puffer resuspendiert und anschließend in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 2 µl Plasmid-DNA (Kapitel 2.5.6) oder 10 µl Ligations- oder SLIC-Ansatz (Kapitel 2.5.10 und 2.5.11) zu einem Aliquot gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C und die Zugabe von 700 µl LB-Medium. Abhängig von der auszubildenden Resistenz (Tab. 2.4) erfolgte eine Inkubation bei 37°C auf einem Rotator (12 UpM). Danach wurden die Zellen auf selektivem LB-Agarplatten ausgestrichen, bevor diese für mindestens 16 h bei 37°C inkubiert wurden.

Tab. 2.4: Für *E. coli* genutzte Antibiotika zur Plasmidstabilisierung und die dazugehörige Regenerationszeit nach der Transformation

Antibiotikum	Konzentration [µg/ml]	Regenerationszeit nach der Transformation [h]
Ampicillin	100	0,5
Kanamycin	50	2

2.4.4 Kultivierung von *B. subtilis*

B. subtilis wurde unter den folgenden Bedingungen kultiviert:

2.4.4.1 Kultivierung in Reagenzgläsern

Für die Plasmidisolierung aus *B. subtilis* (Kapitel 2.5.6) wurden 3 ml selektives LB-Medium (Kapitel 2.4.1) mit einem Einzelklon inokuliert und für mindestens 16 h bei 37°C auf einem

Rotator (12 UpM) kultiviert. Anschließend wurden 2 ml Kultur für die Isolierung der darin befindlichen Plasmid-DNA entnommen.

2.4.4.2 Kultivierung in Mikrotiterplatten

Die *B. subtilis* Kultivierung für Hochdurchsatz-Screenings erfolgte in Mikrotiterplatten (MTPs; V-Boden, transparent von VWR, Radnor, Pennsylvania, USA).

Für Vorkulturen wurden 150 μ l oLB-Medium (Kapitel 2.4.1) mit einer Einzelkolonie inokuliert. Die anschließende Kultivierung erfolgte für mindestens 16 h bei 30°C und 900 UpM auf einem Inkubationsschüttler (TiMix Control, Edmund Bühler GmbH, Hechingen).

Für Hauptkulturen wurden 145 μ l oLB-Medium mit 5 μ l Vorkultur inokuliert. Anschließend wurde für 24 h bei 900 UpM und 30°C auf einem Inkubationsschüttler kultiviert.

2.4.4.3 Kultivierung in FlowerPlates

Alle anderen Kultivierungen wurden in FlowerPlates (FlowerPlate® MTP 48-well, OFF oder B, m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland) durchgeführt.

Für Vorkulturen wurde jeweils 1 ml selektives oLB-Medium (Tab. 2.6) mit einer Einzelkolonie inokuliert und anschließend bei 30°C und 1100 UpM auf einem Inkubationsschüttler für mindestens 16 h kultiviert.

Offline-Kultivierung von Hauptkulturen

Für anschließende Hauptkulturen wurde 1000 μ l selektives oLB-Medium in FlowerPlates (FlowerPlate® MTP 48-well, OFF) auf eine OD_{580nm} von 0,05 inokuliert und anschließend für 24 h bei 30°C und 1100 UpM auf einem Inkubationsschüttler kultiviert.

Online-Kultivierung von Hauptkulturen

Hauptkulturen, deren Wachstum oder Fluoreszenzentwicklung *online* verfolgt werden sollte, wurden in einem „BioLector® Mikrobioreaktorsystem“ (BioLector, m2p-labs GmbH, Baesweiler) für 24 h bei 30°C und 1.100 UpM in FlowerPlates (FlowerPlate® MTP 48-well, B) kultiviert. Während der Kultivierung konnten vom BioLector® verschiedene Parameter gemessen werden (Tab. 2.5).

Tab. 2.5: Angewendete Parameter für *online* Messungen im Biolector.

Parameter	Verstärkung
Biomasse: Streulichtintensität gemessen bei 620 nm	25
eYFP Filter: $\lambda_{Ex.} = 508 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{Em.} = 532 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$	100
mCherry Filter: $\lambda_{Ex.} = 580 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{Em.} = 610 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$	100

2.4.5 Herstellung und Transformation von natürlich kompetenten *B. subtilis*-Zellen

Für die Herstellung von natürlich kompetenten *B. subtilis*-Zellen (modifiziert nach Anagnostopoulos et al., 1961) wurden zunächst *B. subtilis*-Zellen auf einer LB-Agarplatte (Kapitel 2.4.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Agarplatte mit Paris-Medium (60 mM K₂HPO₄, 40 mM KH₂PO₄, 3 mM Trinatriumcitrat, 20 mM Kalium-L-Glutamat, 21 mM MgSO₄, 1 % (w/v) Glukose, 20 mg/ml L-Tryptophan, 0,1 % (w/v) Caseinhydrolysat) gewaschen. Mit diesem Plattenabwasch wurden 2,5 ml Paris-Medium auf eine OD_{580nm} von 0,2 inokuliert und für 4 h bei 37°C auf einem Rotator (12 UpM) kultiviert. Die natürlich kompetenten Zellen wurden danach mit Glycerol (10 % (v/v) Endkonzentration) versetzt, zu je 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurde ein Aliquot mit 900 µl Paris-Medium und 500 ng Plasmid-DNA versetzt. Es folgte eine Kultivierung auf einem Rotator (12 UpM) für 6 h bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend auf selektiven LB-Agarplatten (Tab. 2.6) ausgestrichen und für mindestens 16 h bei 37°C inkubiert.

Tab. 2.6: Für *B. subtilis* genutzte Antibiotika und deren Konzentrationen.

Antibiotikum	Konzentration [µg/ml]
Kanamycin	50
Chloramphenicol	5

2.4.6 Lagerung von Bakterien

Für die Lagerung von Bakterien wurde 1,8 ml der zu lagernden Kultur mit 138 µl DMSO versetzt und bei -80°C gelagert. Für die Lagerung von Vorkulturen in MTPs oder FlowerPlates® wurde jedem Well Glycerol (20 % (v/v) Endkonzentration) zugeführt, bevor die Platten ebenfalls bei -80°C gelagert wurden.

2.4.7 Blau-Weiß-Selektion

Bei der Blau-Weiß-Selektion (nach Vieira et al., 1982) befindet sich in dem Abschnitt des Plasmides, in welchem das Zielgen integriert werden soll, das Gen der LacZα-Untereinheit. Als Klonierungskontrolle, ob *lacZα* erfolgreich gegen das Zielgen ausgetauscht werden konnte, wurde dem selektiven LB-Agar vor dem Gießen der Platten der Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal; 75 µg/ml) und IPTG (1 mM) für die *lacZα* Expression zugeführt. Anschließend wurden die zu kontrollierenden Klonierungsansätze in *E. coli* DH5α (Kapitel 2.4.3) eingebracht und die Zellen auf den vorher angefertigten LB-Agarplatten ausgestrichen. Bei erfolgloser Klonierung bildet die noch auf dem Plasmid kodierte LacZα-Untereinheit mit dem genomisch integrierten ω-Peptid ein funktionsfähiges LacZ, welches den

Farbstoff X-Gal zu Galactose und dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo hydrolysieren kann. Die dadurch blau eingefärbten Klone können deutlich von den nicht gefärbten Klonen, welche *lacZα* verloren haben, unterschieden werden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (nach Saiki et al., 1988) in einem 50 µl Reaktionsansatz (Tab. 2.7) nach in Tab. 2.8 aufgeführten Reaktionsbedingungen. Eingesetzt wurde entweder isolierte Plasmid-DNA (Kapitel 2.5.6) oder isolierte genomische DNA (Kapitel 2.5.7), um den Zielgenabschnitt mit Hilfe flankierender Primer zu amplifizieren.

Tab. 2.7: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Menge [µl]	Komponente
34	<i>A. dest</i>
10	5x Phusion® GC-Puffer
1	10 mM dNTP-Mix
1	DNA (50-100 ng/µl)
1	<i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)
1	<i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)
1,5	DMSO
0,5	Phusion® Polymerase

Tab. 2.8: Reaktionsbedingungen der durchgeführten PCRs.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit (min:sec)
Initiale Denaturierung	98	00:30
Denaturierung	98	00:30
Hybridisierung	X	00:30
Elongation	72	Y
Finale Elongation	72	10:00

} 30x

Die Hybridisierungstemperatur X wurde abhängig von den verwendeten Primern (Tab. 2.3) unter Verwendung des „CloneManager 9“ (Scientific & Educational Software) bestimmt. Die Elongationszeit Y wurde basierend auf der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und der Geschwindigkeit der Phusion®-Polymerase mit 1000 bp/sec gewählt. Durchgeführt wurden die PCRs im „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg). Der Erfolg einer PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.5.3) überprüft.

2.5.2 QuikChange®-PCR

Für die ortsspezifische DNA-Mutagenese wurde die QuikChange®-PCR verwendet (modifiziert nach Edelheit et al., 2009). Die verwendeten Oligonukleotide enthielten die gewünschte Mutation und waren zueinander komplementär. Um die damit einhergehende Dimerisierung

der Primer zu verhindern, erfolgte die Amplifikation zunächst in zwei getrennten Reaktionsansätzen von je 25 µl mit jeweils nur einem der beiden Primer. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt und die Amplifikation fortgesetzt (Tab. 2.9). Die Reaktion wurde im „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Tab. 2.9: Reaktionsbedingungen für die QuikChange®-PCR.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit (min:sec)	
Initiale Denaturierung	98	01:00	} 5x
Denaturierung	98	00:30	
Hybridisierung	X	00:30	
Elongation	72	03:30	
Finale Elongation	72	10:00	
Vereinigung beider Ansätze			
Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit (min:sec)	
Initiale Denaturierung	98	01:00	} 18x
Denaturierung	98	00:30	
Hybridisierung	X	00:30	
Elongation	72	3:30	
Finale Elongation	72	10:00	

Die Hybridisierungstemperatur wurde abhängig von den verwendeten Primern unter Nutzung des „CloneManager 9“ (Scientific & Education Software) gewählt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit 1 µl (10 U/µl) DpnI versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert, um die methylierte *template* DNA zu hydrolysieren.

2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese (nach Vogelstein et al., 1979) wurden PCR-Produkte (Kapitel 2.5.1 und 2.5.2) und hydrolysierte DNA-Fragmente (Kapitel 2.5.9) analysiert. Agarosegele wurden aus 1 % (w/v) Agarose und 0,5 x TBE-Puffer (89 mM Borsäure, 2,5 mM Na₂-EDTA, 89 mM Tris) hergestellt. Die Agarose wurde durch Erhitzen gelöst und anschließend mit 0,00125 % (v/v) MIDORI^{GREEN} Advance (NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland) versetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit ¼ ihres Volumens mit 5x DNA-Probenpuffer (0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM Na₂-EDTA, 43 % (v/v) Glycerin) gemischt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in 0,5 x TBE-Puffer für 30 min bei 120 V durchgeführt. Als DNA-Größenstandard dienten 2,5 µl GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA). Für die Dokumentation wurden die Agarosegele mit dem Gel iXImager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) erfasst. Die DNA wurde mit einem Blue/Green LED Transilluminator (NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland) sichtbar gemacht.

2.5.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Im Anschluss an die Auftrennung der Proben (Kapitel 2.5.3) wurden die zu isolierenden Banden aus dem Agarosegel geschnitten. Die Reinigung erfolgte mit dem „innuPREP DOUBLEpure“ Kit (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben. Eluiert wurde mit 20 µl erwärmtem nukleasefreiem Wasser.

2.5.5 Reinigung von DNA

Die Reinigung von PCR-Produkten (Kapitel 2.5.1 und 2.5.2), welche in der Analyse mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.5.3) keine Nebenprodukte enthielten, erfolgte mit dem „innuPREP DOUBLEpure“ Kit (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben.

2.5.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5α wurde das Kit „innuPREP Plasmid Mini“ (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben (*isolation of high copy plasmid DNA*) verwendet. Die Elution der DNA erfolgte in erwärmten nukleasefreiem Wasser.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *B. subtilis* erfolgte nach demselben Protokoll. Zusätzlich wurde ein Lyseschritt nach der Zugabe des Resuspensionspuffers integriert. Bei diesem Schritt wurden 10 µl einer Lysozym-Lösung (10 mg/ml) in die Suspension überführt, bevor für 30 min bei 37°C inkubiert wurde.

2.5.7 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit „DNeasy Blood & Tissue“ Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aus *B. subtilis*-Zellen isoliert.

2.5.8 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit dem Mikrovolumen Spektralphotometer „NanoDrop 2000c“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

2.5.9 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (nach Sambrook et al., 1989) wurde für die Konstruktion (40 µl Ansatz) oder Überprüfung (10 µl Ansatz) von Plasmiden durchgeführt. Für die Zusammensetzung und genauen Durchführungsbedingungen der

Restriktion wurde bei der Verwendung von mehr als einem Restriktionsenzym das Programm „DoubleDigest Calculator“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) genutzt.

2.5.10 Sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung

Für die sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung (*sequence and ligation independent cloning*, SLIC) nach Jeong et al., 2012 wurde sowohl das zu integrierende DNA-Fragment als auch der Zielvektor in einer PCR mit homologen Überhängen amplifiziert (Kapitel 2.5.1). Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Kapitel 2.5.3), mit 1 µl DpnI versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden die PCR-DpnI-Ansätze gereinigt (Kapitel 2.5.5). Für einen SLIC-Ansatz wurde ein molekulares Verhältnis von 1:2 (Vektor/*insert*) eingesetzt, wobei immer 100 ng Vektor-Fragment genutzt wurden. Zur Berechnung der einzusetzenden Menge des *inserts* wurde der „Ligation calculator“ (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) genutzt. Zusätzlich wurden 1 µl 10x BSA und 1 µl NEB Puffer 2 in die Reaktion eingesetzt, bevor auf 10 µl mit nukleasefreiem H₂O aufgefüllt wurde. Zum Starten der Reaktion wurden danach 0,2 µl der T4-DNA-Polymerase hinzugegeben. Der SLIC-Ansatz wurde für 2,5 min bei Raumtemperatur (RT) mit einer anschließenden 10-minütigen Inkubation auf Eis inkubiert. Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit dem gesamten Ansatz transformiert (Kapitel 2.4.3).

2.5.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Um die Religation von Vektor-DNA zu vermeiden, wurde zunächst das 5'-Phosphat des Vektors enzymatisch hydrolysiert. Dafür wurden 20 µl der zuvor aus einem Agarosegel isolierten Vektor-DNA (Kapitel 2.5.4) mit 1 µl der thermosensitiven Alkalinen Phosphatase „Fast-AP“ versetzt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 37°C und anschließend für 5 min bei 75°C zur thermischen Inaktivierung.

Für die Ligation wurde die T4 DNA-Ligase und ein molekulares Verhältnis von Vektor zu integrierendem Fragment von 1:5 verwendet (Dugaiczky et al., 1975). Die Ligationsansätze bestanden aus 1 µl T4 Ligase-Puffer, 0,5 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl), X µl Vektor-DNA (100 µg) und Y µl *insert* und wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Zur Berechnung der einzusetzenden Menge an *insert* Fragment wurde der „Ligation calculator“ (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) genutzt. Ligierte wurde für 30 min bei 22°C, bevor die Ligase durch eine Inkubation für 10 min bei 65°C inaktiviert wurde.

Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen mit dem gesamten Ansatz transformiert (Kapitel 2.4.3).

2.5.12 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit von der Firma LGC Genomics (Berlin, Deutschland) mit folgenden Primern durchgeführt:

MUL1NEU: 5'-GCCTCGCAGGACACACACTTTATG-3'

MUL1-REV: 5'-AGGTGAATTAGCTTGGAATTGCG-3'

pJOEInsertfw: 5'-CTAAAGCTTAGGCCAGTCGAAAG-3'

pJOEInsertrev: 5'-GATTTGAGTCAGCTAGGAGGTG-3'

Seq-htrA-H1-fw: 5'-CGTCTCAATAAATAGCTCATTCTC-3'

Pgrac-fw: 5'-AAGAATGATGTAAGCG-3'

2.5.13 Bestimmung von Transkriptmengenänderungen mittels *real-time* qPCR

Das gesamte Verfahren wurde nach Skoczinski et al., 2017 durchgeführt.

2.5.13.1 Isolierung bakterieller RNA

Die Isolierung bakterieller RNA aus *B. subtilis* erfolgte unter Nutzung des „NucleoSpin®RNA“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) des „RNase-free DNase Sets“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) und des „DNA-free™ Kits“ (Ambion®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Isoliert wurde aus 1 ml einer *B. subtilis* Hauptkultur nach 24 h Kultivierung (Kapitel 2.4.4). Die Zellen wurden als erstes für 1 min bei 21.000g sedimentiert und das Pellet wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Isolierung wurde das Pellet zunächst in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM Na₂-EDTA, pH 8,0) resuspendiert und anschließend mit 2 µl einer Lysozym-Lösung (40 mg/ml) versetzt. Die Zellsuspension wurde dann für 10 min bei 37°C inkubiert, bevor sie mit 350 µl RA1-Puffer des „NucleoSpin®RNA Kits“ und 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt wurde. Die Suspension wurde gut gemischt und auf einen violetten NucleoSpin®-Filter überführt. Das Filtrat, welches durch eine Zentrifugation für 1 min bei 11.000g entstanden ist, wurde mit 350 µl 70 % (v/v) RNase-freiem Ethanol versetzt und auf einen blauen NucleoSpin®-Filter gegeben. Danach wurde für 30 sec bei 11.000g zentrifugiert, bevor 350 µl MBD-Puffer des „NucleoSpin®RNA Kits“ auf den Filter gegeben wurden. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 11.000g erfolgte der erste DNA-Verdau unter Nutzung der rDNase des „NucleoSpin®RNA Kits“. Die Probe wurde mit 95 µl

eines rDNase-Reaktionspuffer-Gemisches (10 µl rDNase auf 90 µl Reaktionspuffer) versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde für 15 sec bei 11.000g zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA-Degradation mit dem „RNase-free DNase Set“ fortgeführt. Dafür wurde die darin enthaltene DNase zunächst in 550 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert, bevor auf jede Probe 10 µl DNase und 70 µl dazugehöriger RDD-Puffer gegeben wurden. Nach erneuter Inkubation für 15 min bei RT wurden 200 µl des RAW2-Puffers des „NucleoSpin®RNA Kits“ hinzugegeben und für 30 sec bei 11.000g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und 600 µl des RA3-Puffers wurden auf den Filter gegeben. Es wurde für 30 sec bei 11.000g zentrifugiert und 250 µl des RA3-Puffers wurden auf den Filter gegeben. Anschließend wurde für 2 min bei 11.000g zentrifugiert, bevor das Filtrat verworfen und die RNA in 47 µl nukleasefreiem Wasser eluiert wurde. Der dritte DNase-Verdauungsschritt wurde mit dem „DNA-free™ Kit“ durchgeführt. Dafür wurde der eluierten RNA 5 µl 10 x DNase-Puffer und 1 µl DNase zugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C wurden 5 µl des beigefügten Inaktivierungspuffer zugegeben und gemischt. Das Gemisch wurde anschließend für 2 min bei 21.000g zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Die RNA-Konzentration der dabei gewonnen RNA-Lösung wurde bestimmt (Kapitel 2.5.8) und die Proben bei -20°C gelagert.

2.5.13.2 Reverse Transkription

Für das Umschreiben der isolierten RNA (Kapitel 2.5.13) in cDNA wurde das „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Es wurden 1000 ng RNA, 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl des Enzym-Mix eingesetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle für die anschließend durchzuführende quantitative *real-time* PCR (Kapitel 2.5.13.3) diente ein Ansatz, welchem weder Reaktionspuffer noch Enzym-Mix zugesetzt wurden. Die Reverse Transkription wurde im „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach nachfolgendem Programm durchgeführt (Tab. 2.10)

Tab. 2.10: Reaktionsbedingungen der reversen Transkription.

Temperatur [°C]	Dauer (min:sec)
25	10:00
50	15:00
85	05:00
4	∞

2.5.13.3 Quantitative *real-time* PCR und Berechnung der relativen Transkriptmengenunterschiede

Die zur Quantifizierung der RNA nach Schmittgen et al., 2008 genutzten Primer (Tab. 2.2) wurden mit dem Programm „Primer3“ (Untergasser et al., 2012, Koressaar et al., 2007) unter Berücksichtigung der folgenden Parameter ausgewählt (Tab. 2.11).

Tab. 2.11: Parameter für das Programm Primer3 zur Generierung geeigneter Primer für die quantitative *real-time* PCR.

Parameter	Inhalt
Produktlänge	100-150 bp
Primerlänge	18-30 bp (optimal: 20 bp)
Schmelztemperatur der Primer	63-67°C (optimal: 64°C)
Primer GC-Gehalt	40-60 % (optimal 50 %)
Schmelztemperatur des Produktes	65-85°C (optimal: 75°C)

Für die quantitative *real-time* PCR wurden Reaktionsansätze mit 20 µl Gesamtvolumen aus 10 µl SYBR™ Green/POX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 50 ng cDNA und jeweils 0,2 µM der spezifischen Primer hergestellt. Als Negativkontrolle wurden Reaktionsansätze mit 50 ng RNA anstelle von cDNA aus 2.5.13.2 verwendet. Die PCR wurde anschließend unter den in Tab. 2.12 aufgeführten Bedingungen im „7900HT Fast Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems, Waltham, USA) durchgeführt.

Tab. 2.12: Programm der quantitativen *real-time* PCR.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit (min:sec)
Initiale Denaturierung	95	10:00
Denaturierung	95	00:15
Hybridisierung und Elongation	60	01:00

} 30x

Zur Ermittlung des C_T -Wertes wurde mit der Software „Sequence Detection System SDS3.2“ (Applied Biosystems, Waltham, USA) die Fluoreszenz des SYBR™ Green Farbstoffes analysiert. Mit den C_T -Werten wurden die relativen Transkriptmengenänderungen mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ nach Schmittgen et al., 2008 berechnet. Dafür wurden zunächst die ermittelten C_T -Werte des zu untersuchenden Transkripts auf den Wert des Haushaltsgens *sigA* des *B. subtilis*-Stammes bezogen. Die dadurch erhaltenen ΔC_T -Werte wurden auf die ΔC_T -Werte eines Referenzstammes bezogen ($\Delta\Delta C_T$ -Wert), bevor die $\Delta\Delta C_T$ -Werte als Exponenten zur Basis 2 eingesetzt ($2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Wert) wurden. Die dazugehörigen Abweichungen wurden folgenderweise berechnet:

$$\text{Obere Abweichung} = (2^{-(\Delta\Delta C_T - SD)}) - 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\text{Untere Abweichung} = 2^{-\Delta\Delta C_T} - (2^{-(\Delta\Delta C_T + SD)})$$

2.5.14 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Für die Hybridisierung von teilweise komplementären Oligonukleotiden (modifiziert nach Altenbuchner, 2016) wurden die zu hybridisierenden Oligonukleotide zunächst in einem molekularen Verhältnis von 1:1 in 50 µl zusammengegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min bei 99°C aufgekocht, bevor es mit 1°C/min abgekühlt wurde.

2.5.15 Herstellung von *B. subtilis* DB430 *knock-in* Mutanten mit der CRISPR/Cas9-Methode

Für die einfache Konstruktion von *Knock-in* Mutanten wurde die CRISPR/Cas9-Methode (nach Jinek et al., 2012) ausgewählt.

Das CRISPR/Cas9-System ist ein adaptives Immunsystem in Prokaryoten, welches gegen eindringende, mobile DNA-Elemente vorgeht, indem es diese durch das Einfügen eines Doppelstrangbruches (DSB) degradiert (Barrangou et al., 2007, Selle et al., 2015). Es besteht aus dem CRISPR-Array (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), was ein DNA-Abschnitt mit sich regelmäßig wiederholenden palindromischen Sequenzen, unterbrochen von variablen Regionen (Spacer), ist, und den damit assoziierten Proteinen (*CRISPR-associated*, Cas). Die Spacer dienen als molekulares Immungedächtnis und repräsentieren virale DNA-Sequenzen, die zuvor in die Wirtszelle ohne Infektion eindringen konnten. Für die Immunantwort wird der gesamte CRISPR-Array zu einer vorläufigen CRISPR-RNA (pre-crRNA) transkribiert. Im Anschluss daran binden die *trans*-aktivierenden crRNAs (tracrRNAs) aufgrund ihrer Komplementarität die palindromischen Wiederholungen, bevor in weiteren Prozessierungsschritten aus je einem Spacer und einer palindromischen Sequenz mit der daran gebundenen tracrRNA die crRNA entsteht. Dieser RNA-Komplex bindet an dem komplementären Abschnitt (Protospacer-DNA) der erneut eingedrungenen DNA und rekrutiert die Ribonuklease Cas9, welche anschließend einen DSB am 3'-Ende der Protospacer-DNA einfügt (Marraffini et al., 2010, Jiang et al., 2013). Zur Erhöhung der Genauigkeit des Cas9-vermittelten DSB, werden nur Sequenzen hydrolysiert, die am 3'-Ende der Protospacer-DNA ein Protospacer angrenzendes Motiv (PAM) aufweisen. Dieses besteht bei der Cas9 aus der Basenabfolge 5'-NGG-3' (Deltcheva et al., 2011). Molekularbiologisch kann dieses System zum Erzeugen von Mutanten genutzt werden (Abb. 2.1).

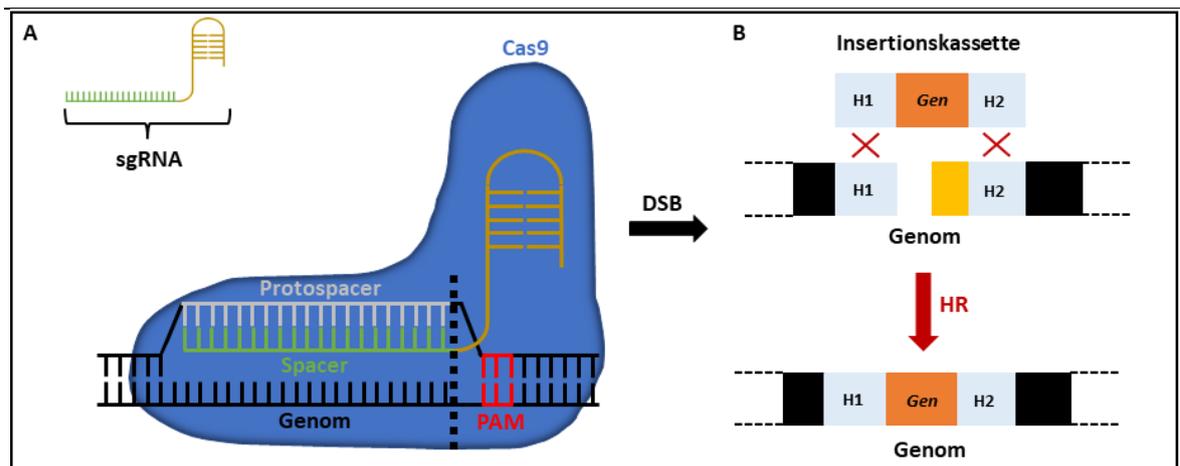


Abb. 2.1: Prinzip der molekularen Nutzung von CRISPR/Cas9 zur Erzeugung von *knock-in* Mutanten. Das Prinzip ist für eine einfachere Übersicht als Schema dargestellt. **A** Cas9 und die für den gezielten Doppelstrangbruch (DSB) nötigen molekularen Bestandteile. **B** Reparatur des DSB über homologe Rekombination (HR) mit spezifischen Insertionskassetten, wodurch gleichzeitig das Zielgen genomisch integriert wird. Nähere Erläuterungen befinden sich im Fließtext.

Dafür werden zunächst in dem zu mutierenden DNA-Abschnitt nach einem Protospacer und PAM gesucht. Anschließend wird ein zu dem Protospacer komplementärer synthetischer Spacer konstruiert, der an die sgRNA fusioniert wird. Bei der sgRNA wiederum handelt es sich um ein Fusionsprodukt aus crRNA und tracrRNA (Jinek et al., 2012). Durch die Koproduktion von sgRNA und Cas9 wird der DSB zwischen Protospacer und PAM eingefügt. Für die Erzeugung von *knock-in* Mutanten werden gleichzeitig Insertionskassetten konstruiert, welche stromaufwärts und -abwärts zu dem DSB homologe Bereiche (H1 und H2) und zusätzlich zwischen diesen Bereichen das zu inserierende Zielgen aufweisen. Diese Kassetten können über die homologe Rekombination (HR) zur Reparatur des DSB ins Genom der Bakterien integriert werden, wobei auch das Zielgen integriert wird (Altenbuchner, 2016). In dieser Arbeit wurde das CRISPR/Cas9 Plasmid pJOE8999-1 (Tab. 2.2) genutzt.

2.5.15.1 Herstellung der *sfGFP knock-in* Mutanten *B. subtilis* PAL2 bis PAL4

Konstruktion der CRISPR/Cas9-Plasmide

Für die genomische Integration in den *htrA* Locus wurde mit CRISPy-Web (Blin et al., 2016) ein geeignetes PAM (5'-AGG-3') mit dazugehöriger Spacer-Sequenz (5'-TACATCCGTGAGGTCGCTTC-3') identifiziert. Für die Fusion der Spacer-Sequenz mit der sgRNA auf dem pJOE8999-1 wurden zunächst die beiden Oligonukleotide *htrA*-sgRNA1 und *htrA*-sgRNA2 hybridisiert (Tab. 2.3; Kapitel 2.5.14). Dadurch entstand ein DNA-Fragment, welches neben der Spacer-Sequenz komplementäre Überhänge zu BsaI-Schnittstellen trug. Anschließend wurde dieses Fragment in den mit BsaI hydrolysierten pJOE8999-1 (Kapitel 2.5.9) ligiert (Kapitel 2.5.11). Die erfolgreiche Ligation und somit Konstruktion des Vektors pJOE-

sgRNA:htrA (Tab. 2.2) wurde über Blau-Weiß-Selektion und anschließender Sequenzierung verifiziert (Kapitel 2.4.7 und 2.5.12). Für die Reparatur des DSB durch HR wurden zunächst der gesamte homologe Bereich einschließlich *htrA* mit den Primern fw-htrA-H1 und rev-htrA-H2 (Tab. 2.3) von isolierter genomischer *B. subtilis* DB430-DNA (Kapitel 2.5.7) mittels PCR amplifiziert (Kapitel 2.5.1). Das dabei entstandene DNA-Fragment, welchem primervermittelt terminal die Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym *SfiI* angefügt wurden, und der zuvor generierte pJOE-sgRNA:htrA wurden mit *SfiI* hydrolysiert (Kapitel 2.5.9) und anschließend zum Plasmid pJOE-sgRNA:htrA_H1H2 (Tab. 2.2) ligiert (Kapitel 2.5.11). Auf diesem Plasmid aufbauend, wurden für die Reparatur über HR drei verschiedene Insertionskassetten konstruiert (Abb. 2.2).

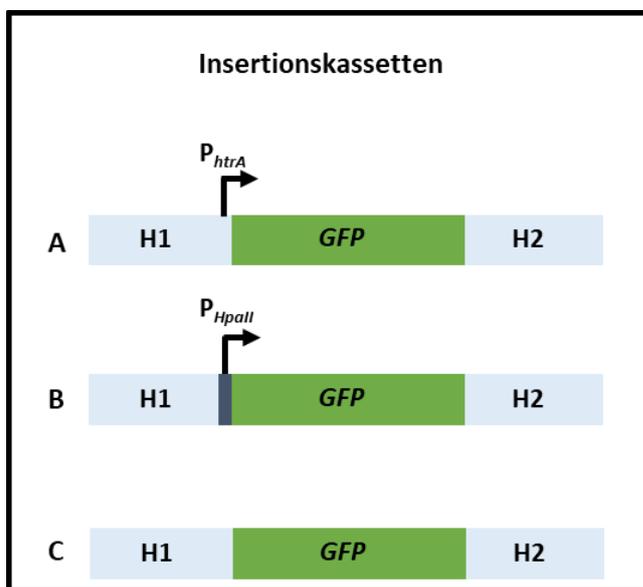


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Insertionskassetten für die Konstruktion von *knock-in* Mutanten im *htrA* Lokus von *B. subtilis*. Erzeugung von Insertionskassetten für homologe Rekombination. Die Insertionskassetten kodieren *sfGFP*, das von den zu den Enden des Doppelstrangbruches homologen Bereichen H1 und H2 flankiert wird. **A** Für den Sekretionsstress-Biosensor ist *sfGFP* unter Kontrolle des P_{htrA} Promotors. **B** Positivkontrolle für die *sfGFP*-Produktion unter Kontrolle des konstitutiven P_{HpaII} Promotors **C** Konstrukt A mit Deletion des Promotors als Negativkontrolle.

Die Erzeugung des Sekretionsstress-Biosensors erfolgte durch die Konstruktion einer Insertionskassette

für P_{htrA} Promotor kontrolliertes *sfGFP*. Dafür wurde *sfGFP* in den *htrA* Lokus zwischen denen für die homologe Rekombination nötigen homologen Bereichen H1 und H2 integriert. Als Positiv- und Negativkontrolle für die *sfGFP*-Produktion wurden zusätzlich Insertionskassetten konstruiert, bei welchen entweder die *sfGFP*-Expression unter Kontrolle des konstitutiven P_{HpaII} Promotors oder nicht Promoter-kontrolliert war. Für die Insertionskassette des Sekretionsstress-Biosensors (Abb. 2.2A), wurde das Plasmid pJOE-sgRNA:htrA_H1H2 mit den Primern fw-htrA-H2 und rev-SLIC-PhtrAfull (Tab. 2.3) und das Plasmid pHT01-sfGFP1-11 mit den Primern fw-SLIC-sfGFP und rev-XagI-GFP (Tab. 2.3) mit einer PCR mit komplementären Überhängen amplifiziert und im nächsten Schritt mittels SLIC zum Plasmid pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrAfull-GFP ligiert (Kapitel 2.5.1 und 2.5.10; Tab. 2.2). Für die Konstruktion der *sfGFP* Positivkontrolle (Abb. 2.2B), wurde das Plasmid pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrAfull-GFP mit dem Primerpaar SLIC-fw-pJOE-PhpaII/SLIC-rev-pJOE-PhpaII (Tab. 2.3) und der P_{HpaII} Promotor vom Plasmid pBSMul1(SPBox)-SPNprE-EXLX1 (Tab. 2.2) mit dem Primerpaar SLIC-fw-PhpaII/SLIC-

rev-PhpaII (Tab. 2.3) mittels PCR mit komplementären Überhängen amplifiziert (Kapitel 2.5.1). Anschließend wurde zur Erzeugung des Plasmides pJOE-sgRNA:htrA-htrA::P_{HpaII}-GFP (Tab. 2.2) beide per PCR amplifizierten Fragmente mittels SLIC ligiert (Kapitel 2.5.10). Das letzte Plasmid pJOE-sgRNA:htrA-htrA::GFP wurde als Negativkontrolle ohne einen Promotor konstruiert (Abb. 2.2C). Dafür wurde das Plasmid pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrA_{full}-GFP einmal mit dem Primerpaar fw-GFP-ohnePromotor/ rev-Xagl-GFP und einmal mit den Primern fw-htrA-H2 und rev-htrA-H1ohneP (Tab. 2.3) amplifiziert (Kapitel 2.5.1), bevor beide Fragmente mittels SLIC ligiert wurden (Kapitel 2.5.10).

Herstellung von *B. subtilis* DB430 Mutanten über CRISPR/Cas9

Zur Erzeugung der *knock-in* Mutanten wurde *B. subtilis* DB430 über natürliche Kompetenz mit jeweils einem der generierten Plasmide transformiert (Kapitel 2.4.5) und auf selektiven LB-Agarplatten mit 0,2 % (w/v) Mannose für die Induktion der *cas9* Expression ausgestrichen. Zum Verlust des jeweiligen CRISPR/Cas9 Plasmides nach der putativ erfolgreichen Mutantenerzeugung wurden am nächsten Tag die Kolonien auf eine frische LB-Agarplatte überführt und bei 50°C für 24 Stunden kultiviert. Bei einer Kultivierung bei 50°C können sich pJOE8999-1-Derivate durch ihren temperatursensitiven Replikationsursprung nicht mehr replizieren (Arnaud et al., 2004). Nach Wiederholung dieses Schrittes wurden die Kolonien hinsichtlich des Verlustes der Antibiotikaresistenz untersucht. Dafür wurden die Klone auf Platten mit und ohne Kanamycin überführt und es wurde überprüft, welche ausschließlich auf den LB-Agarplatten wachsen konnten, denen kein Kanamycin zugeführt wurde. Aus putativen *knock-in* Kolonien wurde die genomische DNA isoliert (Kapitel 2.5.7) und mittels PCR mit den Primern fw-htrA-H1 und rev-htrA-H2 amplifiziert (Tab. 2.3; Kapitel 2.5.1) und über Sequenzierung mit Seq-htrA-H1-fw kontrolliert (Kapitel 2.5.12). Mit Hilfe der drei Insertionskassetten konnten die Stämme *B. subtilis* PAL2 (Abb. 2.2B), *B. subtilis* PAL3 (Abb. 2.2C) und *B. subtilis* PAL4 (Abb. 2.2A) hergestellt werden.

2.5.15.2 Herstellung des mCherry-basierten Sekretionsstress-Biosensors *B. subtilis* PAL5

Für die Herstellung eines *mCherry*-basierten Sekretionsstress-Biosensors wurde sowohl der Vektor pJOE-sgRNA:htrA-htrA::PhtrA_{full}-GFP mit den Primern fw-htrA-H2/rev-SLIC-PhtrA_{full} als auch *mCherry* vom Plasmid pJT^Tmcs-mCherry (Tab. 2.2) mit den Primern fw-SLIC-mCherry/rev-SLIC-mCherry (Tab. 2.3) mittels PCR mit geeigneten homologen Überhängen amplifiziert (Kapitel 2.5.1) und anschließend mittels SLIC zum Plasmid pJOE-sgRNA:htrA_htrA::PhtrA_{full}-mCherry ligiert (Kapitel 2.5.10; Tab. 2.2). Anschließend wurde mit diesem Plasmid *B. subtilis* PAL5 erzeugt (Kapitel 2.5.15.1)

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Proteinpräzipitation

Zur Präzipitation aller im Kulturüberstand befindlichen Proteine (nach Peterson, 1977) wurde die Probe mit 1/10 Volumen einer 1 % (w/v) NaDoc-Lösung versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis, wurde 1/10 Volumen einer 40 % (w/v) TCA-Lösung zugegeben. Erneut wurde für 10 min auf Eis inkubiert, bevor für 30 min bei 4°C und 21.000g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vollständig verworfen, bevor das präzipitierte Proteinpellet mit ½ Volumen einer eiskalten 80 % (v/v) Aceton-Lösung gewaschen wurde. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet.

2.6.2 Bestimmung von Gesamtproteinkonzentrationen

Die Gesamtproteinkonzentrationen in gereinigten Detektor- (Kapitel 2.6.6) oder sfGFP-Lösungen wurden mit dem Mikrovolumen Spektralphotometer „NanoDrop 2000c“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle mittels SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970) zu analysierende Proben wurden zunächst auf eine OD_{580nm} von 50 eingestellt (100 mM Tris, pH 8). Anschließend wurde den Proben 2x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau) zugesetzt, bevor diese für mindestens 10 min bei 99°C aufgeköcht wurden. Danach wurden jeweils 15 μ l der Proben auf 4-12 % Bis-Tris Gele (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard diente der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in „XCell SureLock™“ Laufkammern (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei einer Spannung von 200 V über 40 min in MES-Puffer (50 mM MES, 50 mM Tris-HCl, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM Na_2 -EDTA, pH 7,3). Die Gele wurden anschließend mit Kolloidal Coomassie (nach Merril, 1990) angefärbt.

2.6.4 Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Cutinase

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* (modifiziert nach Winkler et al., 1979) wurde das kolorimetrische Substrat *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) genutzt. Das farblose *p*NPP wird durch die Cutinase in

Palmitat und *p*-Nitrophenolat durch die Hydrolyse der Esterbindung gespalten, welches in basischer Lösung eine bei $\lambda = 410$ nm detektierbare gelbe Färbung hat. Nach der Kultivierung (Kapitel 2.4.4) wurden die Proben mittels Zentrifugation in Zellpellet und zellfreien Kulturüberstand separiert. Der Überstand wurde, wenn nicht anders angegeben, 40-fach mit 100 mM Tris-HCl pH 8 verdünnt und 10 μ l dieser Verdünnung wurden in einer MTP mit 190 μ l der Substratlösung (47,22 mM Na_2HPO_4 , 2,77 mM KH_2HPO_4 , 1,11 mg/ml *Gummi arabicum*, 2,3 mg/ml NaDoc, 3 mg/ml *p*NPP) vermischt. Die Absorptionsänderung bei $\lambda = 410$ nm wurde anschließend für 15 min bei 37°C im „SpectraMax 250 Plattenphotometer“ (Molecular Devices, Biberach an der Riss, Deutschland) gemessen. Die volumetrische Aktivität wurde anschließend mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 15.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet und, solange nicht anders angegeben, auf die $\text{OD}_{580\text{nm}}$ normiert.

2.6.5 Bestimmung der β -Glukuronidaseaktivität

Die enzymatische Aktivität der β -Glukuronidase GUS wurde mit Hilfe des kolorimetrischen Substrates *p*-Nitrophenyl- β -D-Glukuronid (*p*NPG; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) bestimmt (modifiziert nach Cui et al., 2016). Das durch die Umsetzung von *p*NPG entstehende *p*NP kann analog zu Kapitel 2.6.4 in basischer Lösung bei $\lambda = 410$ nm detektiert werden. Zunächst wurden dafür jeweils 100 μ l der GUS-produzierenden *B. subtilis* Hauptkulturen (Kapitel 2.4.4) in eine MTP überführt und mit 25 μ l PBS-Lysozym-Puffer (10 mg/ml Lysozym, 137 mM NaCl_2 , 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) versetzt. Für die Zelllyse wurde für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate 40-fach mit PBS-Puffer verdünnt. 50 μ l dieser Verdünnung wurden mit 50 μ l Substrat-Lösung (0,5 mg/ml *p*NPG in PBS-Puffer) vermischt. Die Reaktion wurde für 1 min bei RT inkubiert, bevor diese durch Zugabe von 100 μ l 1 M Na_2CO_3 gestoppt wurde. Abschließend wurde die Absorption bei $\lambda = 410$ nm im „SpectraMax 250 Plattenphotometer“ (Molecular Devices, Biberach and der Riss, Deutschland) gemessen und die volumetrische Aktivität (U/ml) mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von *p*NP ($\epsilon = 15.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Danach wurde, solange nicht anders angegeben, die Aktivität auf die $\text{OD}_{580\text{nm}}$ normiert.

2.6.6 Produktion und Reinigung des Detektors für den Split GFP Assay

Die Produktion des für den Split GFP Assay benötigten Detektors erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) (modifiziert nach Santos-Aberturas et al., 2015). Dafür wurde zunächst *E. coli* BL21(DE3) mit einem Detektorplasmid transformiert (Kapitel 2.4.3). Nach der Regenerationszeit wurden

10 ml selektives LB-Medium mit 10 μ l des Transformationsansatzes inokuliert, bevor die Kultur für mindestens 16 h bei 37°C und 130 UpM kultiviert wurde. Anschließend wurden 500 ml selektives LB-Medium mit dieser Vorkultur auf eine $OD_{580nm} = 0,05$ inokuliert. Die Hauptkultur wurde für 2 h bei 37°C und 130 UpM kultiviert, bevor die Expression des Detektorgens mit 1 mM IPTG induziert wurde. Es wurde für weitere 5 h bei den gleichen Kultivierungsbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 3.000g bei 4°C für 20 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 25 ml TNG-Puffer (10 % (v/v) Glycerin, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,4) resuspendiert und für 5 min mit einer Sonotrode (Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA) beschallt (max. 35 %, 50 % Zyklus). Danach wurde erneut für 20 min bei 3.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Schritte der Resuspension in 25 ml TNG-Puffer, die Ultraschallbehandlung und die abschließende Zentrifugation wurden zwei Mal wiederholt. Da der produzierte Detektor unlöslich und somit in Aggregaten vorliegt, wurde durch diese Methodik der Detektor sukzessive angereichert. Die Aggregate wurden mit Hilfe eines Pistills (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) in 9 M Harnstoff (1 ml Harnstoff pro 75 mg Aggregat) resuspendiert um 1x Detektor zu erhalten.

2.7 Fluoreszenzbasierte Methoden

2.7.1 Kultivierung und fluoreszenzbasierte Untersuchung von *B. subtilis* in mikrofluidischen Kammern mit Hilfe des iSplit GFP Assays

Die mikrofluidischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Dietrich Kohlheyer, Prof. Dr. Alexander Grünberger und Alina Burmeister durchgeführt.

2.7.1.1 Herstellung von Polydimethylsiloxan Chips

Für die Herstellung der Polydimethylsiloxan (PDMS) Chips (nach Grünberger et al., 2015, Grünberger et al., 2013) wurde zunächst mit SU-8-Photolithographie in mehreren Schichten ein strukturierter Silizium-Wafer hergestellt. Dieser diente als Urform für anschließende PDMS Chips. Jeder PDMS-Mikrofluidik-Chip besteht aus vier separaten Kultivierungspassagen mit jeweils mehreren hundert einzelnen Kultivierungskammern (0,7 μ m x 80 μ m x 90 μ m). Durch die geringe Kammerhöhe von 0,7 μ m können die Zellen nur in einer Lage wachsen, was eine genaue Analyse des Zellwachstums durch Bildaufnahmen mit räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglicht. Alle Kultivierungspassagen sind an 10 μ m tiefe Medienzuführungskanäle

angeschlossen, die durch das kontinuierliche Perfundieren mit frischem Medium stabile Kultivierungsbedingungen gewährleisten.

2.7.1.2 Aufbau und genutzte Komponenten für mikrofluidische Experimente

Die mikrofluidischen Experimente wurden mit einem automatisierten Inversmikroskop (Nikon Eclipse Ti, Nikon, Tokio, Japan) durchgeführt, welches zur Kompensation der Fokusverschiebung während der Zeitrafferaufnahme mit einem Fokuskorrektursystem ausgestattet war. Konstante Temperaturbedingungen wurden mit einer Tisch-Inkubationskammer (PECON, Ebach, Deutschland) gewährleistet. Für eine kontinuierliche Medienversorgung waren die Chips mit einer Spritzenpumpe (neMESYS, CETONI, Korbussen, Deutschland) verbunden. Die kontinuierliche Zeitrafferaufnahme wurde durch die Nikon-Software NIS Elements AR 4.30.02 durchgeführt. Alle 10 min wurden Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder mit einem 100-fachen Ölimmersionsobjektiv (CFI Plan Apo Lambda DM 100 x Vergrößerung, NA 1,45) aufgenommen, wobei die Propidiumiodid-Fluoreszenz mit einem mCherry-Filter ($\lambda_{\text{Ex.}} = 562 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 641 \text{ nm}$, DM = 593 nm) und die GFP-Fluoreszenz mit einem GFP-Filter ($\lambda_{\text{Ex.}} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 542 \text{ nm}$, DM = 520 nm) aufgenommen wurden.

2.7.1.3 Durchführung mikrofluidischer Experimente

Vor der Kultivierung im mikrofluidischen Chip (nach Probst et al., 2015) wurde eine Vorkultur in 10 ml selektivem oLB-Medium bis zu einer $\text{OD}_{580\text{nm}}$ von 0,5 bei 30°C und 130 UpM angezogen. Die Zellsuspension wurde anschließend mit einer Kanüle in die verschiedenen Chip-Kanäle gefüllt, bis einzelne Zellen in die Kultivierungskammern gelangt sind. Danach wurde den Zellen kontinuierlich frisches selektives oLB-Medium (Kapitel 2.4.1) zugeführt (Flussrate 400 nl min^{-1}). Das Medium enthielt zusätzlich zur Induktion der *GFP1-11(TGA11)*-Expression 1 mM IPTG und für die Durchführung des Propidiumiodid-Assays 1 μM Propidiumiodid (PI) (Krämer 2016). Durch den Propidiumiodid-Assay lassen sich lebende und tote Zellen unterscheiden. PI interkaliert in DNA, woraufhin sich Absorptions- und Emissionsmaximum von 488 und 590 nm zu 535 und 617 nm verschieben. Da der Farbstoff nicht membrangängig ist, kann er nur bei lysierten Zellen mit der DNA interagieren. Die Kultivierung in den Chips erfolgte bei 30°C, die Aufnahme der Bilder alle 10 min.

2.7.2 Durchflusszytometrie zur Analyse des iSplit GFP Assays in *B. subtilis*

Die Durchflusszytometeranalysen wurden in Kooperation mit Dr. Fabienne Hilgers durchgeführt. Für die Expressionsheterogenitätsanalyse auf Einzelzellebene wurde zunächst

eine Hauptkultur (Kapitel 2.4.4.3) bis in die stationäre Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden jeweils 20 µl Kultur in 600 µl PBS-Puffer (pH 7,4) überführt. Die Zellen wurden danach durch Zentrifugation pelletiert, auf eine OD_{580nm} von 0,05 in 100 µl PBS-Puffer eingestellt und in eine MTP überführt. Die Zellen wurden mit dem Amnis® CellStream™ System (Luminex Corporation, Austin, USA) analysiert. Die individuelle GFP-Fluoreszenzhelligkeit jeder Zelle wurde mit einem Anregungslaser $\lambda_{\text{Ex.}} = 488 \text{ nm}$ (15 % Intensität, max. Intensität 200 mW) und einem Emissionsfilter $\lambda_{\text{Em.}} = 528 \pm 46 \text{ nm}$ ausgelesen. Um Zelltrümmer und Zellaggregate rauszufiltern wurden die Zellen auch hinsichtlich ihrer Größe (*forward scatter*, FSC) und ihrer Granularität (*side scatter*, SSC) analysiert. Für die Messung der Zellgröße wurde ein FSC-Laser ($\lambda_{\text{Ex.}} = 450 \text{ nm}$, 50 % Intensität, max. Intensität 200 mW, $\lambda_{\text{Em.}} = 456 \pm 51 \text{ nm}$) und für die Messung der Granularität ein SSC-Laser ($\lambda_{\text{Ex.}} = 785 \text{ nm}$, 50 % Intensität, max. Intensität 200 mW, $\lambda_{\text{Em.}} = 773 \pm 56 \text{ nm}$) genutzt. Ausgehend von dem Streudiagramm FSC gegen SSC wurden die Einzelzellen mit einem *gate* von den irrelevanten Messpunkten für die Fluoreszenzanalyse diskriminiert. Die dabei aufgezeichneten Daten wurden mit der „CellStream™ Analysis“ Software (Luminex Corporation, Austin, USA) ausgewertet.

2.7.3 Nachweis von Proteinen mittels Split GFP Assay in *B. subtilis*

Mit dem Split GFP Assay können Zielproteine aktivitätsunabhängig nachgewiesen werden. Dafür wird das elfte β -Faltblatt des GFP C-terminal an das Zielprotein fusioniert (GFP11-*tag*). Sobald dieser GFP11-*tag* anschließend mit einem nicht fluoreszierenden trunkierten GFP oder einem der GFP-Derivate, welchem das elfte β -Faltblatt fehlt, in räumliche Nähe kommt, können beide Fragmente assemblieren und ein fluoreszierendes holo-Fluoreszenzprotein bilden, dessen Fluoreszenz gemessen werden kann.

2.7.3.1 Nachweis von sekretierten Proteinen

In vitro Anwendung

Für den *in vitro* Nachweis von sekretierten Proteinen in *B. subtilis* (nach Knapp et al., 2017) wurde zunächst die Hauptkultur nach der Kultivierung (Kapitel 2.4.4) mittels Zentrifugation in Zellpellet und zellfreien Kulturüberstand separiert. Anschließend wurden 20 µl des Überstandes in eine MTP überführt und mit 180 µl einer Detektor-Lösung (400 µl 1x Detektor (aus Kapitel 2.6.6), 10 mM Na₂-EDTA, 20 ml TNG-Puffer) gemischt. Für die Rekonstitution des holo-Fluoreszenzproteins wurde die MTP anschließend für mindestens 16 h bei RT und 350 UpM inkubiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit dem „Tecan Infinite M1000 Pro“ (Tecan, Männedorf, Schweiz). Für die Detektion wurden die in Tab. 2.13 aufgeführten

Parameter verwendet. Solange nicht anders angegeben, wurden die Fluoreszenzintensitäten auf eine OD_{580nm} von 1 normiert.

Tab. 2.13: Messparameter für den *in vitro* Split GFP Assay mit allen genutzten Detektorvarianten zur Zielproteindetektion.

Fluoreszenzreporter	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlängenbereich; Auswertungswellenlänge [nm]
GFP	485 ± 5	505-550 ± 5 ; 510
YFP	505 ± 5	520-565 ± 5 ; 530
CFP	435 ± 5	480-540 ± 5 ; 485

***In vivo* Anwendung**

Bei der *in vivo* Anwendung des Split GFP Assays wurden die Kulturen zu Beginn der Kultivierung mit 1 % (w/v) Glukose versetzt. Nach etwa 16-stündiger Kultivierung wurde den Kulturen 3 % (v/v) 1x GFP1-10 zugeführt. Detektiert wurde die holo-GFP-Fluoreszenz entweder wie in Kapitel 2.4.4.3 beschrieben durch einen „BioLector® Mikrobioreaktorsystem“ oder nach der Kultivierung in einem „Tecan Infinite M1000 Pro“ (Tecan, Männedorf, Schweiz). Für die Detektion im Spektrometer wurde die Kultur mit 100 mM Tris-HCl (pH 8) mindestens 10-fach verdünnt. Die Messung erfolgte mit $\lambda_{Ex.} = 485 \pm 5$ nm und $\lambda_{Em.} = 505-550 \pm 5$ nm, wobei für die Auswertung das Emissionsmaximum bei $\lambda_{Em.} = 510$ nm verwendet wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurden diese Werte auf die OD_{580nm} normiert.

2.7.3.2 Nachweis von cytosolischen Proteinen

Der Nachweis von cytosolischen Proteinen wurde nach Lenz et al., 2021 durchgeführt.

***In vitro* Anwendung**

Für die *in vitro* Detektion von cytosolisch produzierten Proteinen in *B. subtilis* wurden zunächst 100 μ l der zu untersuchenden Kulturen in eine MTP überführt. Danach wurden für die Zelllyse jeweils 25 μ l einer PBS-Lysozym-Lösung (10 mg/ml Lysozym, 137 mM NaCl₂, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4) hinzugegeben und für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Für die Rekonstitution des holo-GFP wurden 20 μ l des Zelllysates mit 180 μ l Detektorlösung (400 μ l 1x GFP1-10 (aus Kapitel 2.6.6), 10 mM Na₂-EDTA, 20 ml TNG-Puffer) versetzt und für mindestens 16 h bei RT unter 350 UpM inkubiert. Die Fluoreszenz wurde wie in 2.7.3.1 beschrieben ausgelesen und ausgewertet.

***In vivo* Anwendung**

Für die Nutzung des *in vivo* intrazellulären Split GFP Assays (iSplit GFP Assay) wurde ein Zweiplasmidsystem genutzt. Dabei befand sich das Gen des Zielproteins auf einem pBSMu1-Derivat (Tab. 2.2) und das Gen des Detektors auf einem pHT01-Derivat (Tab. 2.2). Für die Detektion wurden natürlich kompetente *B. subtilis*-Stämme mit beiden Plasmiden

transformiert (Kapitel 2.4.5). Der Hauptkultur (Kapitel 2.4.4) wurde zu Beginn der Kultivierung 1 mM IPTG für die Induktion der Detektorexpression zugeführt. Die durch Rekonstitution entstandene Fluoreszenz wurde entweder direkt in einem „BioLector® Mikrobioreaktorsystem“ (Kapitel 2.4.4.3) oder nach der Kultivierung in einem „Tecan Infinite M1000 Pro“ (Tecan, Männedorf, Schweiz) ausgelesen. Dafür wurde die Kultur in eine MTP überführt und mindestens 10-fach mit 100 mM Tris-HCl (pH 8) verdünnt. Die Messparameter, welche abhängig von dem verwendeten Detektor waren, sind in Tab. 2.14 angegeben. Für die Auswertung wurde bei GFP und YFP das spezifische Emissionsmaximum genutzt. Bei P4 und CFP wurden, um Emissionsmaxima von hohen Hintergrundfluoreszenzintensitäten von *B. subtilis* in dem Wellenlängenbereich (Hill et al., 2009) zu unterscheiden die Fluoreszenzintensitäten von Referenzwellenlängen von diesen subtrahiert. Anschließend wurde, wenn nicht anders angegeben, die Werte auf eine OD_{580nm} von 1 normiert.

Tab. 2.14: Messparameter für den iSplit FP Assay mit den in dieser Arbeit genutzten Detektorvarianten.

Fluoreszenzreporter	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlängenbereich; Auswertungswellenlänge; Referenzwellenlänge [nm]
GFP	485 ± 5	505-550 ± 5; 510
YFP	505 ± 5	520-565 ± 5; 530
CFP	435 ± 5	480-540 ± 5; 485; 480
P4	382 ± 5	440-480 ± 5; 450; 470

2.7.4 Messung der zellulären Stressantwort auf die Proteinsekretion

Bei den in dieser Arbeit konstruierten Sekretionsstress-Biosensoren *B. subtilis* PAL4 und *B. subtilis* PAL5 wurde genomisch *htrA* (nach Trip et al., 2011, Jurischka et al., 2020) mit einem der beiden Fluoreszenzreportergene *sfGFP* oder *mCherry* ausgetauscht. Die Expression des Reportergens wird bei Auftreten von Sekretionsstress (Kapitel 1.3.2.2) hochreguliert. Zur Messung der Stressantwort wurden die in Tab. 2.15 genannten Parameter verwendet. Für die Auswertung wurde das jeweilige Emissionsmaximum genutzt und, solange nicht anders angegeben, auf die OD_{580nm} normiert.

Tab. 2.15: Für die Messung der zellulären Stressantwort auf die (rekombinante) Proteinproduktion genutzte Parameter.

Stamm	Fluoreszenzreporter	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlängenbereich; Emissionsmaximum [nm]
<i>B. subtilis</i> PAL4	<i>sfGFP</i>	485 ± 5	505-550 ± 5; 510
<i>B. subtilis</i> PAL5	<i>mCherry</i>	585 ± 5	605-650 ± 5; 610

2.7.5 Messung des kombinierten Systems zur Analyse der Produktion und Sekretion von Proteinen in *B. subtilis*

Für das kombinierte System wurden der Split GFP Assay, der iSplit P4 Assay und der mCherry-basierte Sekretionsstress-Biosensor zur intra- und extrazellulären Detektion des Zielproteins und dem dabei entstehenden Sekretionsstress kombiniert. Die dafür genutzten Fluoreszenzreporterproteine und die dazugehörigen Messparameter sind in Tab. 2.16 aufgeführt. Für die eindeutige Identifizierung von Fluoreszenzemissionsmaxima wurden die Fluoreszenzintensitäten von Referenzwellenlängen von denen des potenziellen Maximums subtrahiert und anschließend, wenn nicht anders angegeben, auf eine OD_{580nm} von 1 bezogen.

Tab. 2.16: Messparameter bei der kombinierten Analyse der Produktion und Sekretion von Proteinen in *B. subtilis*.

Methode	Fluoreszenzreporter	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlängenbereich; Auswertungswellenlänge; Referenzwellenlänge[nm]
iSplit GFP Assay	P4	382 ± 5	430-460 ± 5; 450; 460
Split GFP Assay	sfGFP	485 ± 5	510-540 ± 5; 510; 530
Sekretionsstress-Biosensor	mCherry	585 ± 5	605-635 ± 5; 610

2.7.6 Aufnahme von Fluoreszenzmissionsspektren

Für die Aufnahme von Fluoreszenzmissionsspektren wurden die zu analysierenden Proben 10-fach mit 100 mM Tris-HCl (pH 8) verdünnt und anschließend unter den in Tab. 2.17 angegebenen Parametern gemessen.

Tab. 2.17: Messparameter bei der Aufnahme von Fluoreszenzmissionsspektren.

Fluoreszenzprotein	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlängenbereich [nm]
sfGFP	485	370-680
mCherry	585	370-680
YFP	505	370-680
CFP	450	370-680
P4	380	370-665

Anschließend wurden die gemessenen Fluoreszenzsignale auf das jeweilige Emissionsmaximum normiert.

2.8 *In silico* Methoden

Die Planung von Klonierungen und die Auswertungen von Sequenzierungsergebnissen wurden mit Hilfe des Programms „CloneManager 9“ (Scientific & Educational Software) durchgeführt. Proteine und ihre Signalpeptide wurden mit dem „SignalP 6.0-Server“ (Teufel et al., 2021) analysiert. Zusätzlich wurde die Hydrophobizität dieser mittels „ProtScale“ (Gasteiger et al.,

2005) nach Kyte und Doolittle bestimmt (Kyte et al., 1982). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (Pearson, 1895) wurde mit Hilfe von „Microsoft Excel 365“ berechnet. RNA Sekundärstrukturen und deren Stabilitätsvorhersagen wurden mit der „Vienna RNA Websuite“ mit „RNAfold 2.4.13“ (Gruber et al., 2008) angefertigt. Zur Bearbeitung der Zeitrafferaufnahmen der mikrofluidischen Untersuchung wurde das Bildprozessierungsprogramm „Fiji“ genutzt (Schindelin et al., 2012). Weitere Berechnungen und Bildbearbeitungen zur grafischen Darstellung wurden mit „Microsoft Excel 365“ und „Microsoft PowerPoint 365“ sowie „Prism8“ durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

B. subtilis ist einer der meistverwendeten Mikroorganismen in der industriellen Biotechnologie zur Gewinnung von homologen und auch rekombinanten Proteinen (Schallmey et al., 2014). Der kontinuierlich wachsende Bedarf an mikrobiell produzierten Proteinen benötigt immer effizientere Produktionen (Rigoldi et al., 2018, Adrio et al., 2014). Dies wird in den meisten Fällen mit ungerichteten Optimierungsstrategien wie etwa dem Screenen von homologen und heterologen Signalpeptid-Banken oder Promotoren erreicht (Brockmeier et al., 2006a, Degering et al., 2010, Song et al., 2016). Für solche Kampagnen müssen oft mehrere Hundert bis Tausend Varianten analysiert werden, weshalb das Zielprotein einfach und kosteneffizient quantifizierbar sein muss.

Aus diesem Grund war das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines kombinierten, fluoreszenzbasierten Systems zum aktivitätsunabhängigen *in vivo* Nachweis der Produktion und Sekretion von Proteinen in dem industriell relevanten Organismus *B. subtilis*. Durch die simultane Messung von sowohl intrazellulär verbliebenem als auch sekretiertem Zielprotein in Kombination mit dem dabei entstandenen Sekretionsstress sollte das kombinatorische System eine umfassende Analyse ermöglichen (Abb. 3.1).

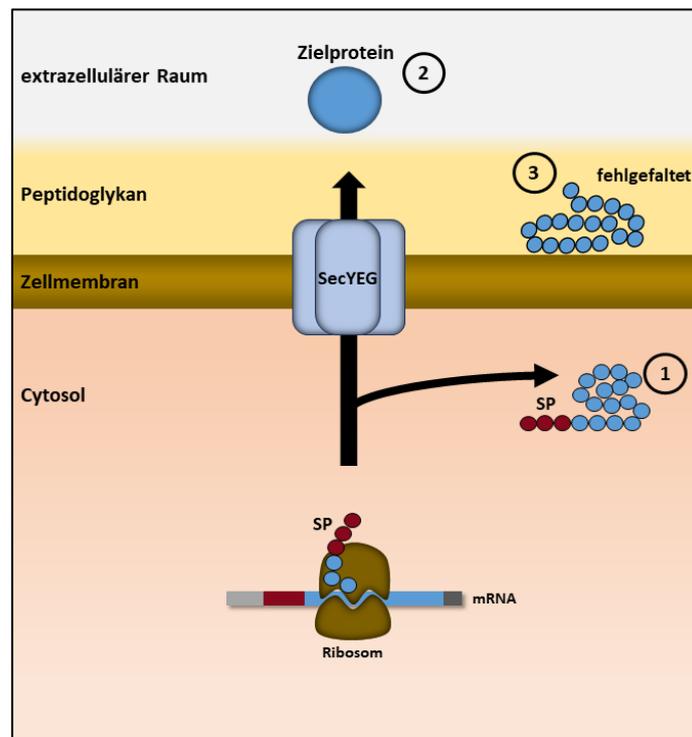


Abb. 3.1: Mögliche Ereignisse der Sec-abhängigen Proteinsekretion, die in *B. subtilis* durch das kombinierte Nachweissystem erfasst werden sollen. Mit dem kombinierten Nachweissystem sollen simultan **1** nicht sekretierte und intrazellulär akkumulierte Zielproteine mit N-terminalem Signalpeptid (SP), **2** über den Sec-Apparat erfolgreich sekretierte Zielprotein und **3** die zelluläre Stressantwort auf die Sekretion von Proteinen durch fehlgefaltetes Protein am Übergang zwischen Zellmembran und Peptidoglykan ausgelesen werden.

3.1 Ein Split GFP-basiertes *in vivo* Nachweissystem für cytosolische Proteine in *B. subtilis*

Bei der industriellen Proteinproduktion wird *B. subtilis* hauptsächlich als Sekretionsstamm verwendet (Schallmey et al., 2004). Die Sekretion von heterologen Proteinen in ausreichenden Mengen ist oft nicht möglich (Freudl, 2018), weshalb in diesen Fällen das Zielprotein intrazellulär in Wirten wie *E. coli* produziert wird (Gomes et al., 2016). Durch das vollständige Fehlen von Endo- und Exotoxinen und dem GRAS-Status (Harwood, 1992) bietet sich *B. subtilis* potenziell auch als Produktionswirt für cytoplasmatische Proteine an, was am Beispiel der S4-Untereinheit des Pertussis-Toxins (Himanen et al., 1990) oder der Trehalosesynthase TreS aus *Pseudomonas putida* ATCC47054 (Liu et al., 2019) gezeigt werden konnte. Dieses Potenzial wurde auch von Forschenden erkannt, weshalb in den letzten Jahren neue Expressionssysteme für die intrazelluläre Produktion entwickelt wurden (Tran et al., 2020, Phan et al., 2015, Tran et al., 2017).

Aus diesem Grund war die Entwicklung einer aktivitätsunabhängigen Nachweismethode für intrazelluläre Proteine in *B. subtilis* nicht nur für die Nutzung in einem kombinierten System von großem Interesse. In der Arbeitsgruppe wurde für die *in vitro* Detektion von sekretierten Zielproteinen der Split GFP Assay etabliert (Knapp et al., 2017). Bei dieser Nachweismethode wird das Zielprotein C-terminal mit dem elften β -Faltblatt des GFP fusioniert (GFP11-tag). Für die Detektion wird ein trunkiertes sfGFP (GFP1-10 oder Detektor), welchem dieses elfte β -Faltblatt fehlt, zugeführt. Anschließend können beide Fragmente zu einem fluoreszierenden holo-GFP rekonstituieren, dessen Fluoreszenz ausgelesen werden kann. Somit ist diese Nachweismethode im Prinzip universell einsetzbar und kann auch für Enzyme und Proteine verwendet werden, deren Aktivitäten nicht durch einfache Methoden (spezifisch) quantifizierbar sind. Der Split GFP Assay wird mit *superfolder* GFP durchgeführt, da dieses eine verbesserte Faltungskinetik im Vergleich zu anderen GFP-Derivaten aufweist (Pédelacq et al., 2005). Wegen der einfachen Anwendbarkeit und Aktivitätsunabhängigkeit des Split GFP Assays war das erste Ziel der vorliegenden Arbeit, auf Basis dieser Methode ein *in vivo* Verfahren zu etablieren, welches intrazelluläre Proteine spezifisch über die Koproduktion des Zielproteins und des Detektors nachweisen lässt (Abb. 3.2).

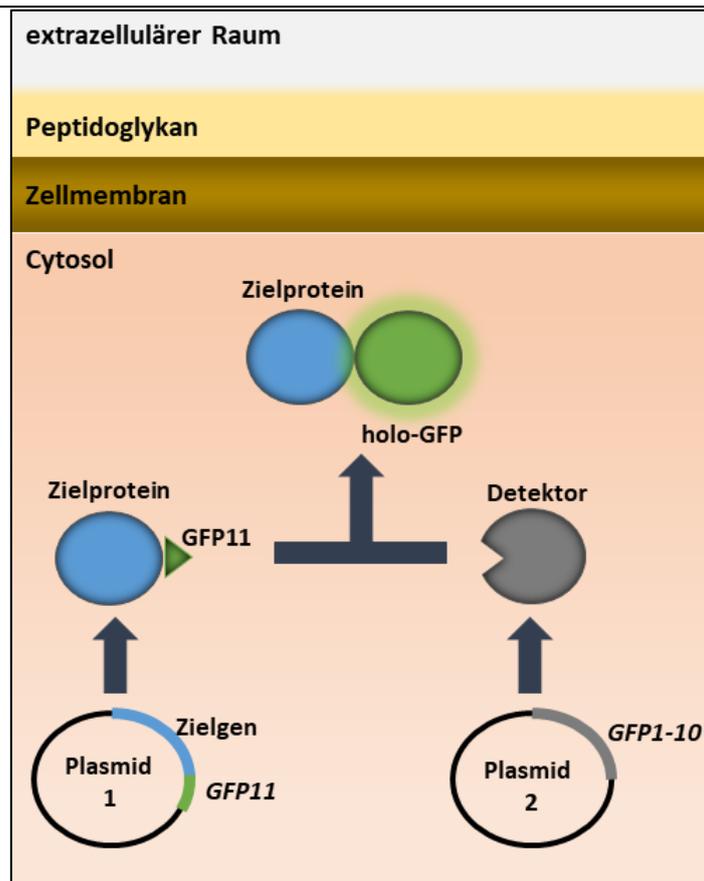


Abb. 3.2: Prinzip des Split GFP Assays als *in vivo* Detektionsmethode für cytosolische Proteine in *B. subtilis*. Der intrazelluläre *in vivo* Split (iSplit) GFP Assay basiert auf einem Zweiplasmidsystem. Auf dem ersten Plasmid liegt das Zielgen mit am 3'-Ende fusionierter Sequenz des elften β -Faltblattes (GFP11-tag) von *sfGFP*. Auf dem zweiten Plasmid liegt das Gen eines trunkeierten *sfGFP*, ohne das elfte β -Faltblatt (Detektor). Nach der Koexpression beider Gene können Detektor und GFP11-tag des Zielproteins assemblieren und zu einem fluoreszierenden holo-GFP rekonstituieren, dessen Fluoreszenz spektrometrisch ausgelesen werden kann.

3.1.1 Der Split GFP Assay als *in vitro* Nachweismethode für intrazelluläre Zielproteine in *B. subtilis*

B. subtilis verfügt über ein stark ausgebildetes intrazelluläres proteolytisches Netzwerk (Harwood et al., 2021), welches die Nachweisempfindlichkeit des Split GFP Assays bei cytosolischen Proteinen beeinflussen könnte. Um zu überprüfen, ob unterschiedliche Mengen des Modellenzymes β -Glukuronidase UidA aus *E. coli* (GUS) über den Split GFP Assay nachgewiesen werden können, wurde die Translation graduell moduliert. In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte durch die Verwendung verschieden langer RBS-Spacer zwischen SD-Sequenz und Startcodon des Gens mit 4 bis 12 nt die GUS-Produktion graduell gesteigert werden (Volkenborn et al., 2020). Die GUS bietet als Modellenzym den zusätzlichen Vorteil, dass einige synthetische Substrate für die einfache kolorimetrische Aktivitätsbestimmung zur Verfügung stehen (Aich et al., 2001, Zhang et al., 2018b). Für die Nutzung des Split GFP Assays wurde zunächst die Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 erzeugt (Tab. 2.2), welche stromaufwärts des GUS11-Gens variable RBS-Spacer von 4 bis 12 nt trägt. Dafür wurde die Sequenz des GFP11-

tags an das 3'-Ende des Gens über zwei PCR Schritte angefügt (Kapitel 2.5.1). Das Gen wurde im ersten Schritt mit den Primern pBSMul_for und GUS-rev-fu1 (Tab. 2.3) vom Plasmid pBS-4nt-GUS (Tab. 2.2) amplifiziert (Kapitel 2.5.1). Dabei wurde primervermittelt am 5'-Ende eine NdeI-Schnittstelle und am 3'-Ende die erste Hälfte der Sequenz des GFP11-*tags* angefügt. Die zweite Hälfte des *tags* sowie eine XbaI-Schnittstelle wurden in einer zweiten PCR mit den Primern pBSMul_for und Rev-Fu2 (Tab. 2.3) ergänzt (Kapitel 2.5.1). Das dabei entstandene PCR-Produkt, welches das rekombinante Zielgen *gus11* beinhaltet, sowie die Plasmidserie pBS-Xnt-GUS, welche sich hinsichtlich variierender RBS-Spacer von 4 bis 12 nt unterschieden, wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und XbaI hydrolysiert (Kapitel 2.5.9). Anschließend wurde das GUS11-Gen mit den Vektor-Rückgraten der hydrolysierten Plasmidserie ligiert (Kapitel 2.5.11), womit die Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 erzeugt wurde (Tab. 2.2). Um zusätzlich neben der Nachweisempfindlichkeit des Split GFP Assays zu überprüfen, ob der GFP11-*tag* einen Einfluss auf die GUS hat, wurde *B. subtilis* DB430 über natürliche Kompetenz mit jeweils einem Plasmid der neu erzeugten Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 (Tab. 2.2) oder mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS (Tab. 2.2) transformiert (Kapitel 2.4.5). Bei beiden Plasmidserien steht die Expression des Zielgens unter Kontrolle des starken konstitutiven P_{HpalI} Promotors (Guan et al., 2016). Zusätzlich wird innerhalb beider Plasmidserien der RBS-Spacer mit 4 bis 12 nt variiert (dargestellt durch Xnt im Namen der Plasmidserien; Abb. 3.3A). Die *B. subtilis* DB430-Transformanden wurden anschließend in FlowerPlates für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Anschließend wurden nach dem Zellaufschluss die relativen Proteinmengen für beide GUS-Varianten (GUS und GUS11) über die hydrolytische Aktivität mit dem kolorimetrischen Substrat *pNPG* bestimmt (Kapitel 2.6.5, Abb. 3.3B) und zusätzlich für die GUS-Varianten mit GFP11-*tag* über den Split GFP Assay ausgelesen (Kapitel 2.7.3.2, Abb. 3.3C).

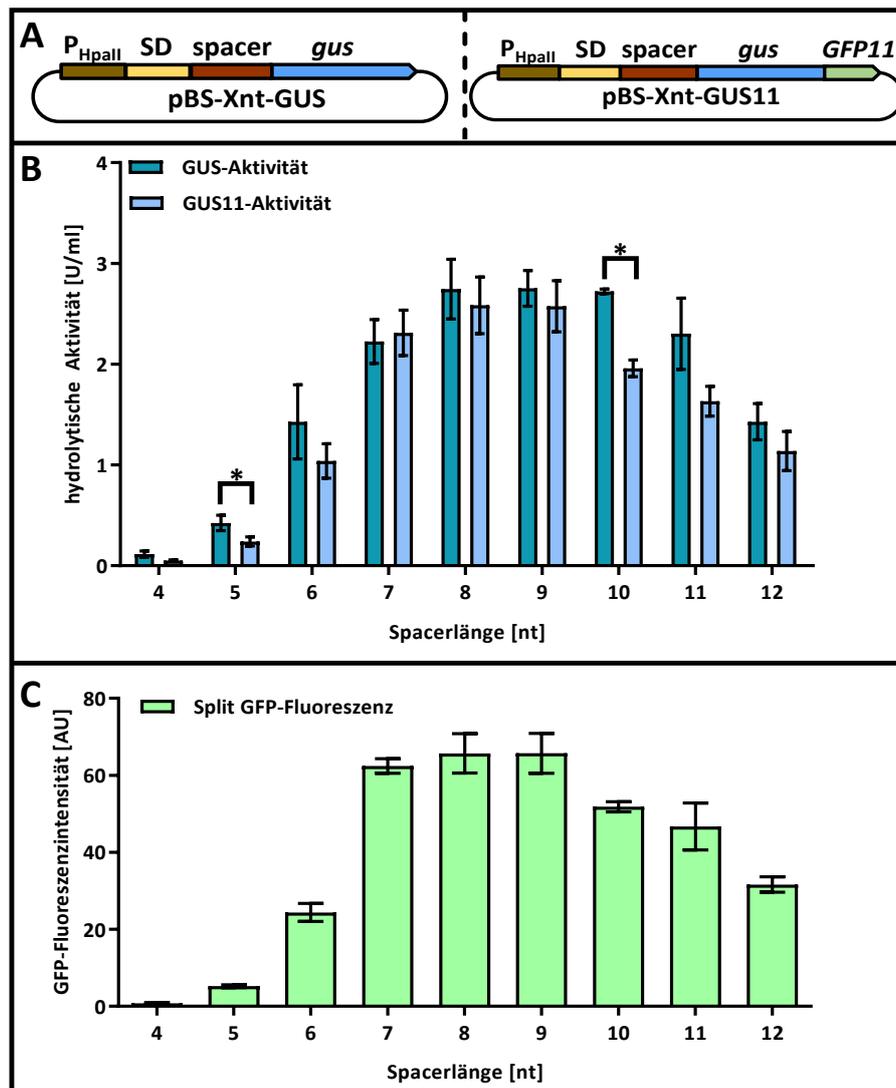


Abb. 3.3: Mit dem Split GFP Assay lassen sich graduelle Unterschiede der GUS11-Akkumulation nachweisen. Die β -Glukuronidase wurde mit Hilfe der Plasmidserien pBS-Xnt-GUS (GUS) bzw. pBS-Xnt-GUS11 (GUS11) in unterschiedlichen Mengen in *B. subtilis* DB430 produziert. **A** Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide für die GUS- oder GUS11-Produktion. Die DNA-Abschnitte sind nicht maßstabsgetreu abgebildet. Bei beiden Plasmidserien steht die *gus(11)* Expression unter Kontrolle des starken konstitutiven P_{HpaII} Promotors. Zusätzlich verfügen die Plasmidserien über RBS-Spacer (spacer) von 4 bis 12 nt (im Namen der Plasmidserie dargestellt durch Xnt) zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon der *gus*. Bei der pBS-Xnt-GUS11 Plasmidserie wurde zusätzlich die DNA-Sequenz des GFP11-tags an das 3'-Ende der *gus* fusioniert. Auf eine OD_{580nm} von 1 normierte **B** enzymatische Aktivitäten der GUS und GUS11-Varianten im Zellysate mit *pNPG* und **C** Split GFP-Fluoreszenzintensitäten der GUS-Varianten mit GFP11-tag. Kultiviert wurde in 1 ml oLB-Medium in FlowerPlates für 24 h bei 30°C und 1100 μ M. Alle Messungen wurden in biologischen und technischen Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mittelwerte. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der biologischen Triplikate wieder. Die statistische Analyse zwischen den Aktivitäten der GUS und GUS11 mit gleichem RBS-Spacer erfolgte unter Anwendung des *t*-Tests, um signifikante Unterschiede von normalverteilten Werten zu ermitteln, * $p < 0,05$. Modifiziert nach Lenz et al., 2021. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0) geschützt.

Anhand der GUS-Aktivitäten konnte zunächst gezeigt werden, dass trotz der C-terminalen Fusion des GFP11-tags die GUS-Produktion weiterhin mit variierenden RBS-Spacern graduell moduliert werden konnte. In beiden Fällen war mit einem 4 nt RBS-Spacer die geringste Aktivität messbar ($0,11 \pm 0,03$ U/ml GUS; $0,05 \pm 0,01$ U/ml GUS11). Die Zielproteinproduktion

konnte bis zu einem Spacer von 8 bzw. 9 nt gesteigert werden (GUS: $2,75 \pm 0,30$ U/ml; GUS11: $2,58 \pm 0,28$ U/ml), bevor sie mit längeren RBS-Spacern wieder abnahm (12 nt-GUS: $1,43 \pm 0,16$ U/ml; 12 nt-GUS11: $1,13 \pm 0,17$ U/ml). Einzig die Aktivitäten bei dem 5 und 10 nt RBS-Spacer unterschieden sich zwischen der GUS und der GUS11 signifikant, wobei auch diese Werte im allgemeinen Trend der Aktivitätssignale blieben. Wie in älteren Publikationen, wurde auch hier gezeigt, dass der GFP11-*tag* nur einen minimalen negativen Einfluss auf die Zielproteinproduktion bzw. -aktivität hat (Knapp et al., 2017, Bakkes et al., 2021). Der für die GFP11-markierten GUS-Varianten zusätzlich durchgeführte Split GFP Assay (Abb. 3.3C) zeigte eine ähnliche Verteilung der Fluoreszenzsignalintensitäten, wie die zuvor gemessenen Aktivitäten (Abb. 3.3B). Die geringste GFP-Fluoreszenzintensität war ebenfalls bei der Variante mit 4 nt langem RBS-Spacer ($0,75 \pm 0,29$ AU) und die höchste bei 8 bzw. 9 nt messbar ($65,70 \pm 4,97$ AU). Es konnte eine starke Korrelation ($r=1,00$ mit $R^2=0,99$; Abb. 7.1A im Anhang) zwischen beiden Messmethoden nachgewiesen werden, wodurch der Split GFP Assay als aktivitätsunabhängige Detektionsmethode variabler Mengen cytoplasmatischen Proteins eingesetzt werden kann.

3.1.2 Die Nutzung des Zweiplasmidsystems beeinflusst die graduelle GUS11-Produktion nicht

Nach der Etablierung des *in vitro* Split GFP Assays für cytoplasmatische Proteine (Kapitel 3.1.1), sollte auf Basis dieses Systems ein *in vivo* Detektionssystem über die intrazelluläre Koproduktion des Zielproteins mit dem Detektor erzeugt werden. Für die Koproduktion wurde ein Zweiplasmidsystem bestehend aus dem Vektor pBSMul1 (Tab. 2.2) für die Zielgenexpression unter Kontrolle des starken konstitutiven P_{Hpall} Promotors und dem pHT01 (Tab. 2.2) Plasmid für die Expression des Detektorgens unter Kontrolle des induzierbaren P_{grac} Promotors ausgewählt. Die Nutzung von zwei Plasmiden ermöglicht einen einfachen Austausch des Zielproteins aber auch des gesamten Expressionssystems, ohne den Split GFP Assay zu beeinflussen. Zur Überprüfung, inwiefern die zusätzliche Produktion eines zweiten Proteins die Zielproteinproduktion beeinflusst, wurde die Koproduktion der GUS11 mit *sfGFP* als einfach über die Fluoreszenz nachzuweisendes Protein evaluiert. Dafür wurde *B. subtilis* DB430 als Kontrolle des Einplasmidsystems mit dem Plasmid pHT01-*sfGFP*1-11 (Tab. 2.2) oder mit dem Plasmid pBS-8nt-GUS11 und für die Messungen im Zweiplasmidsystem mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 und mit dem Plasmid pHT01-*sfGFP*1-11 transformiert (Kapitel 2.4.5; Abb. 3.4A). Die erhaltenen Transformanten wurden für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.4.4.3) und die *sfGFP*-Expression zu

Kultivierungsbeginn mit 1 mM IPTG induziert. Die GUS11-Menge wurde indirekt über die hydrolytische Aktivität mit *pNPG* bestimmt (Kapitel 2.6.5), wohingegen *sfGFP* über die spektrometrisch messbare Fluoreszenz (Kapitel 2.7.3) ausgelesen wurde (Abb. 3.4B).

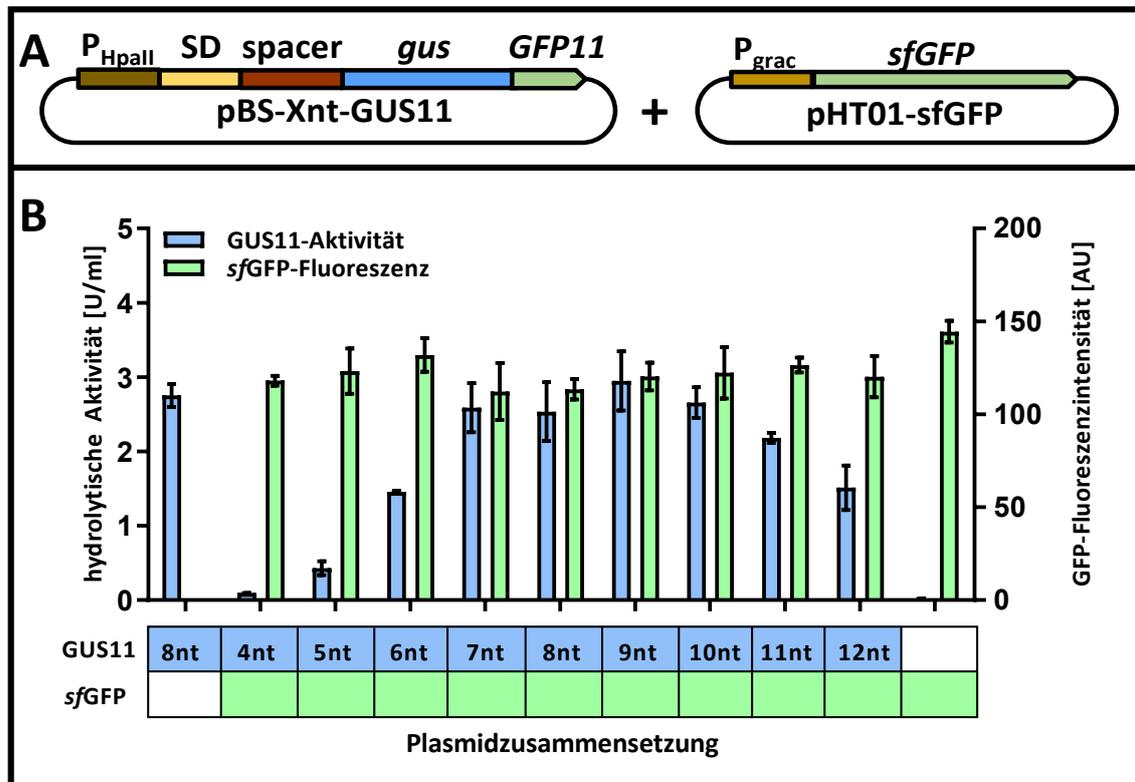


Abb. 3.4: Hydrolytische Aktivität der GUS11 und *sfGFP*-Fluoreszenz in einem Zweiplasmidsystem. A Schematische Darstellung der genutzten Plasmide. Die DNA-Abschnitte sind nicht maßstabsgetreu abgebildet. B. *subtilis* DB430 wurde mit jeweils einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11, welche neben *gus11* noch verschieden lange RBS-Spacer (spacer; 4 bis 12 nt, hier gezeigt am Xnt im Namen der Plasmidserie) und den starken konstitutiven P_{HpaII} Promotor tragen, und zusätzlich mit dem Plasmid pHT01-*sfGFP* transformiert. Das Plasmid pHT01-*sfGFP* trägt für die *sfGFP*-Produktion das dazugehörige Gen unter Kontrolle des starken induzierbaren P_{grac} Promotors. Für die Einplasmidsystemkontrollen wurde *B. subtilis* DB430 entweder mit dem Plasmid pBS-8nt-GUS11 oder pHT01-*sfGFP* transformiert. B Auf eine OD_{580nm} von 1 normierte hydrolytische Aktivitäten im Zelllysate der GUS11-Varianten mit *pNPG* (blau) und *sfGFP*-Fluoreszenzintensitäten (grün). Die Expression von *sfGFP* wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG zu Kultivierungsbeginn induziert. Die Stämme wurden in 1 ml oLB-Medium für 24 h bei 30°C in FlowerPlates bei 1100 UpM kultiviert. Die Messungen wurden in biologischen und technischen Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mittelwerte. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der biologischen Triplikate. Modifiziert nach Lenz et al., 2021. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0) geschützt.

Ein möglicher Einfluss des Zweiplasmidsystems auf die Zielprotein- und *sfGFP*-Produktion wurde durch die graduelle GUS11-Produktion mittels variierender RBS-Spacer überprüft. Die Verlängerung des RBS-Spacers von 4 auf 8 nt führte zu einer fast 30-fachen Aktivitätssteigerung und ist vergleichbar zur Nutzung eines Plasmides (Abb. 3.3). Ebenfalls zeigte die allein produzierte GUS11 im Vergleich ähnliche Aktivitäten wie bei der Koproduktion der GUS11 mit *sfGFP* auf (Einplasmidsystem: $2,75 \pm 0,15$ U/ml; Zweiplasmidsystem: $2,53 \pm 0,34$ U/ml). Dies

lässt auf keinen oder einen vernachlässigbaren Einfluss des Zweiplasmidsystems auf die GUS-Produktion schließen. Durch die *sfGFP*-Kontrolle konnte gezeigt werden, dass mit der Koproduktion die *sfGFP*-Fluoreszenz von $144,39 \pm 5,85$ AU um durchschnittlich 17 ± 4 % signifikant verringert wurde, wobei keine Korrelation zwischen der GUS11-Aktivität und der *sfGFP*-Fluoreszenzabnahme zu beobachten war ($r=-0,02$ mit $R^2= 0,00$; Abb. 7.1B im Anhang). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Abnahme der *sfGFP*-Fluoreszenzintensität unabhängig von der akkumulierten GUS11-Menge ist und etwa durch das Ausbilden der zweiten Antibiotikaresistenz beeinflusst sein könnte (Panayotatos, 1988). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei der Nutzung eines Zweiplasmidsystems die graduelle GUS11-Produktion unverändert blieb, während die *sfGFP*-Produktion unabhängig von der GUS11-Produktion verringert war. Das Zweiplasmidsystem kann daher für die Entwicklung eines intrazellulären Sensors weiter angewendet werden.

3.1.3 Das Detektorprotein kann erst nach Optimierung der Transkriptstabilität in ähnlichen Mengen wie *sfGFP* produziert werden

Für die Nutzung eines *in vivo* Nachweissystems auf Basis des Split GFP Assays muss das Detektorprotein in ausreichenden Mengen produziert werden. Da es unmöglich ist, diese genau zu definieren, wurde zunächst überprüft, ob der Detektor in vergleichbaren Mengen wie das Volllängen-*sfGFP* produziert werden konnte. Aus diesem Grund war der nächste Schritt der Austausch des *sfGFP* durch das Gen des Detektors. Dafür wurde sowohl das Vektor-Rückgrat pHT01-*sfGFP*1-11 mit dem Primerpaar Vf-pHT01/Vr-pHT01 (Tab. 2.3) als auch das *GFP1-10* vom Plasmid pET22b-*GFP1-10* (Tab. 2.2) mit den Primern 1f-i-pET22b-s-o(Vec) und 1r-i-pET22b-s-o(Vec) (Tab. 2.3) mittels PCR amplifiziert (Kapitel 2.5.1). Beide Fragmente, mit primervermittelten komplementären Überhängen, wurden anschließend über SLIC (Kapitel 2.5.10) zu dem Plasmid pHT01-*GFP1-10* (Tab. 2.2) zusammengefügt. Anschließend wurden zur Analyse der Detektorproduktion natürlich kompetente *B. subtilis* DB430 entweder mit dem Plasmid pHT01-*GFP1-10* oder mit dem Plasmid pHT01-*sfGFP*1-11 transformiert (Kapitel 2.4.5; Abb. 3.5A). Die Transformanten wurden unter Standardbedingungen für 24 Stunden kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Die *sfGFP*- beziehungsweise *GFP1-10*-Expression wurde durch 1 mM IPTG induziert. Die intrazelluläre Proteinakkumulation wurde durch eine SDS-PAGE (Kapitel 2.6.3) analysiert (Abb. 3.5B).

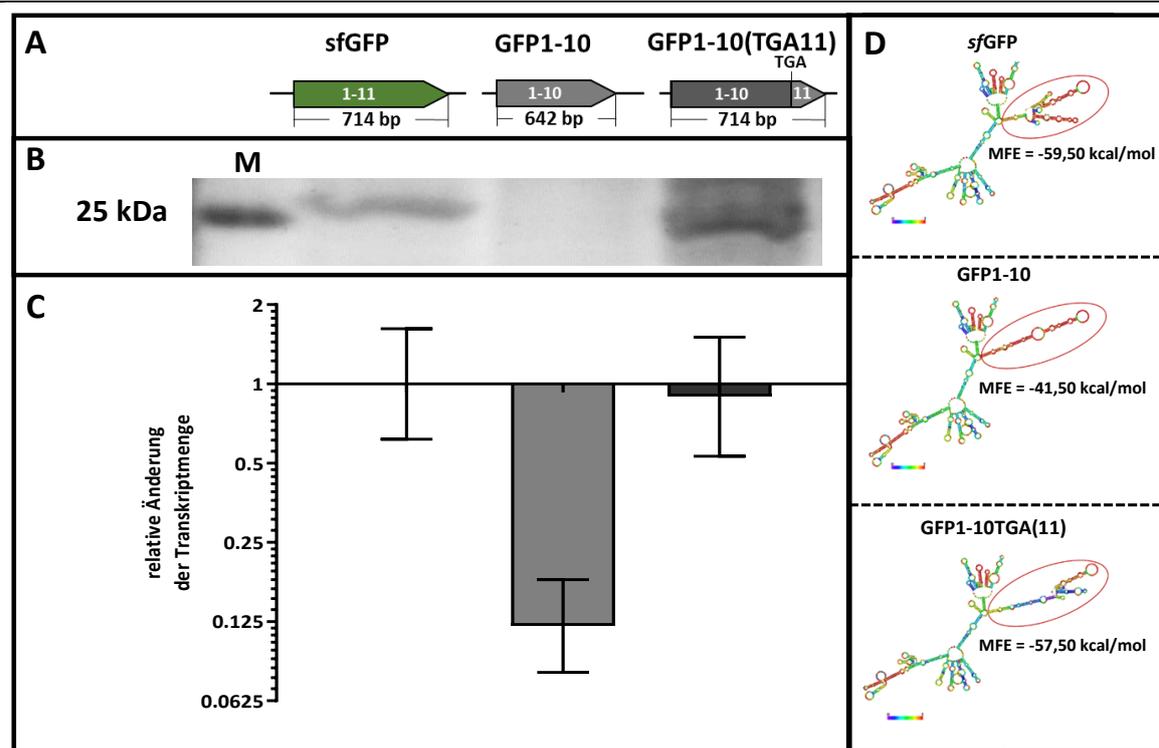


Abb. 3.5: Analyse der Protein- und Transkriptakkumulation von *sfGFP* und den Detektorvarianten *GFP1-10* und *GFP1-10(TGA11)*. **A** Schematische Darstellung der Genvarianten, welche entweder für *sfGFP* oder eines der Detektorderivate kodieren. **B.** *subtilis* DB430 wurde entweder mit dem *sfGFP* kodierenden Plasmid pHT01-*sfGFP*1-11 oder mit einem der Detektorderivate pHT01-*GFP1-10* beziehungsweise pHT01-*iSplitGFP* transformiert. Zusätzlich sind die Längen von *sfGFP* (714 bp), *GFP1-10* (642 bp) und *GFP1-10(TGA11)* (714 bp) angegeben. Die Transformanden wurden für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM in FlowerPlates kultiviert. Zur Expression von *sfGFP* oder eines der Detektorderivate wurde zu Kultivierungsbeginn 1 mM IPTG zugegeben. **B** Ausschnitt eines mit Coomassie gefärbten SDS-Gels (4-12 % Bis-Tris) für den Nachweis der Proteinproduktion. Es wurden jeweils 15 µl der vorher auf eine OD_{580nm} von 50 eingestellten Zellen aufgetragen. Zum Größenvergleich der Proteine wurde ein Molekulargewichtsgrößenstandard („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“) verwendet (M). **C** Relative Änderungen der Transkriptmengen der Detektorgenvarianten im Vergleich zu *sfGFP*. Die quantitative *real-time* PCR wurde in biologischen Dreifachbestimmungen und technischen Vierfachbestimmungen durchgeführt. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mittelwerte. Die Fehlerbalken geben die Abweichungen der biologischen Triplikate wieder. **D** Anhand der minimalen freien Energien (MFE) kalkulierte Strukturen der mRNAs von *sfGFP* und den verwendeten Detektorvarianten. Die Strukturen und angegebenen Energien wurden mit der „Vienna Websuite“, welche auf RNAfold (Lorenz et al., 2011) basiert, kalkulierte. Dargestellt sind die kalkulierten MFEs der 3'-Transkriptenden (rot eingekreister Bereich). Die Strukturwahrscheinlichkeit ist durch einen Farbgradienten von Violett zu Rot dargestellt, wobei Violett einer Wahrscheinlichkeit von 0 entspricht und Rot einer von 1. Abbildung modifiziert nach Lenz et al., 2021. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0) geschützt.

Im Gegensatz zum Volllängen-*sfGFP* konnte das Detektorprotein nicht auf dem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel nachgewiesen werden (Abb. 3.5B). Um zu unterscheiden, ob dies auf Degradation des Detektors durch eine der 13 intrazellulären Proteasen in *B. subtilis* DB430 (Harwood et al., 2021, He et al., 1991) oder auf Probleme in der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist, wurde zusätzlich die Transkriptmenge mittels quantitativer *real-time* PCR bestimmt (Kapitel 2.5.13; Abb. 3.5C). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Transkriptmenge für *GFP1-10* im Vergleich zu der von *sfGFP* achtfach verringert war. Beide

Gene stehen unter der Kontrolle des gleichen Promotors und haben auch eine identische DNA-Sequenz über die ersten 642 bp. Einzig das 3'-Ende beider Sequenzen unterscheidet sich, da *GFP1-10* im Vergleich zu *sfGFP* um 72 bp verkürzt ist (Abb. 3.5A). Entscheidend für die Degradation von mRNA ist oft deren Sekundärstruktur (Hui et al., 2014), weshalb die mRNA Sekundärstrukturen mit Hilfe des Programms RNAfold (Kapitel 2.8) berechnet wurden (Abb. 3.5D). Das 3'-Ende der *sfGFP* mRNA zeigte eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von komplexen, verästelten Strukturelementen. Im Vergleich dazu war die Wahrscheinlichkeit bei dem *GFP1-10* Transkript für eine simple Haarnadelstruktur erhöht. Durch diese strukturellen Unterschiede ist die minimale freie Energie (MFE) der *GFP1-10* mRNA im Vergleich zu der von *sfGFP* am 3'-Ende um 1/3 verringert (-59,50 kcal/mol zu -41,50 kcal/mol; Abb. 3.5D). Solche Strukturen können mRNA-Stabilitäten bzw. -Halbwertszeiten auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Zum einen bietet das *GFP1-10* Transkript mit seiner einfachen, hauptsächlich doppelsträngigen Struktur ideale Angriffsstellen für die Degradation durch die RNase III (Durand et al., 2012b). Zum anderen kann aber auch die komplexe Struktur des *sfGFP*-Transkripts potentielle RNase Erkennungsstellen maskieren (Hui et al., 2014). Da die genaue Ursache nicht ohne weiteres zu identifizieren war, wurde ein neues Detektorgen konstruiert, welches auf mRNA-Ebene dem *sfGFP*-Transkript ähnelt, aber nach der Translation ein trunkiertes Detektorderivat bildet. Dafür wurde mittels QuikChange®-PCR mit den Primern QC-fw-GFPR215STOP und QC-rev-GFPR215STOP (Tab. 2.2) das neue Detektor-Plasmid pHT01-iSplitGFP (Tab. 2.2) generiert (Kapitel 2.5.2). Dabei kodiert das Basentriplett direkt nach der Sequenz des zehnten β -Faltblattes für ein Stoppcodon (*GFP1-10(TGA11)*), wodurch der Detektor auf DNA- und mRNA-Ebene einem *sfGFP* ähnelt, aber auf Proteinebene ein trunkiertes *sfGFP* produziert (Abb. 3.5A). Die kalkulierte Sekundärstruktur dieses *GFP1-10(TGA11)*-Transkriptes (Kapitel 2.8; Abb. 3.5D) zeigte eine hohe Wahrscheinlichkeit für ähnlich komplexe und verästelte Strukturelemente wie das Transkript des *sfGFP*, was auch in einer ähnlichen MFE für das 3'-Ende resultierte (-57,50 kcal/mol). Um zu überprüfen, ob der neu konstruierte Detektor in zu *sfGFP* vergleichbaren Mengen produziert werden konnte, wurde *B. subtilis* DB430 mit dem Plasmid pHT01-iSplitGFP über natürliche Kompetenz transformiert (Kapitel 2.4.5) und für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Die Expression des *GFP1-10(TGA11)* wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die Analyse der Detektorproduktion erfolgte durch quantitative *real-time* PCR (Kapitel 2.5.13) und SDS-PAGE (Kapitel 2.6.3). *GFP1-10(TGA11)* führte, im Gegensatz zu *GFP1-10*, zu einer mit *sfGFP* vergleichbaren Transkriptmenge (Abb. 3.5C). Ebenfalls konnte auf einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel eine vergleichbar starke Produktionsbande für den neuen Detektor

festgestellt werden (Abb. 3.5B). Somit konnte durch die Konstruktion von *GFP1-10(TGA11)* ein trunkierter Detektor erfolgreich produziert werden, der aufgrund seiner nur geringen Änderung der Transkript- und Produktmenge zu *sfGFP* optimale Voraussetzungen für die Nutzung in *in vivo* Split GFP Assays bot.

3.1.4 Das Plasmid pHT01-iSplitGFP ermöglicht die *in vivo* Detektion von intrazellulären Zielproteinen

Der neu konstruierte Detektor GFP1-10(TGA11) konnte in mit *sfGFP* vergleichbaren Mengen produziert werden. Für die Überprüfung, ob diese Mengen zur *in vivo* Detektion von Zielproteinen genügten, wurde als nächster Schritt die Koproduktion der graduell produzierten GUS11 mit GFP1-10(TGA11) analysiert. Dafür wurden natürlich kompetente *B. subtilis* DB430 mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 und zusätzlich mit dem neu konstruierten pHT01-iSplitGFP transformiert (Kapitel 2.4.5; Abb. 3.6A). Die Transformanden wurden unter Standardbedingungen für 24 Stunden kultiviert (Kapitel 2.4.4.3) und die Detektorexpression wurde zu Kultivierungsbeginn mit der Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach der Kultivierung wurde die GUS11-Menge über die hydrolytische Aktivität (Kapitel 2.6.5) und über die messbare iSplit GFP-Fluoreszenz nach *in vivo* Rekonstitution von holo-GFP durch den Detektor mit dem GFP11-tag in lebenden Zellen gemessen (Kapitel 2.7.3.2; Abb. 3.6B).

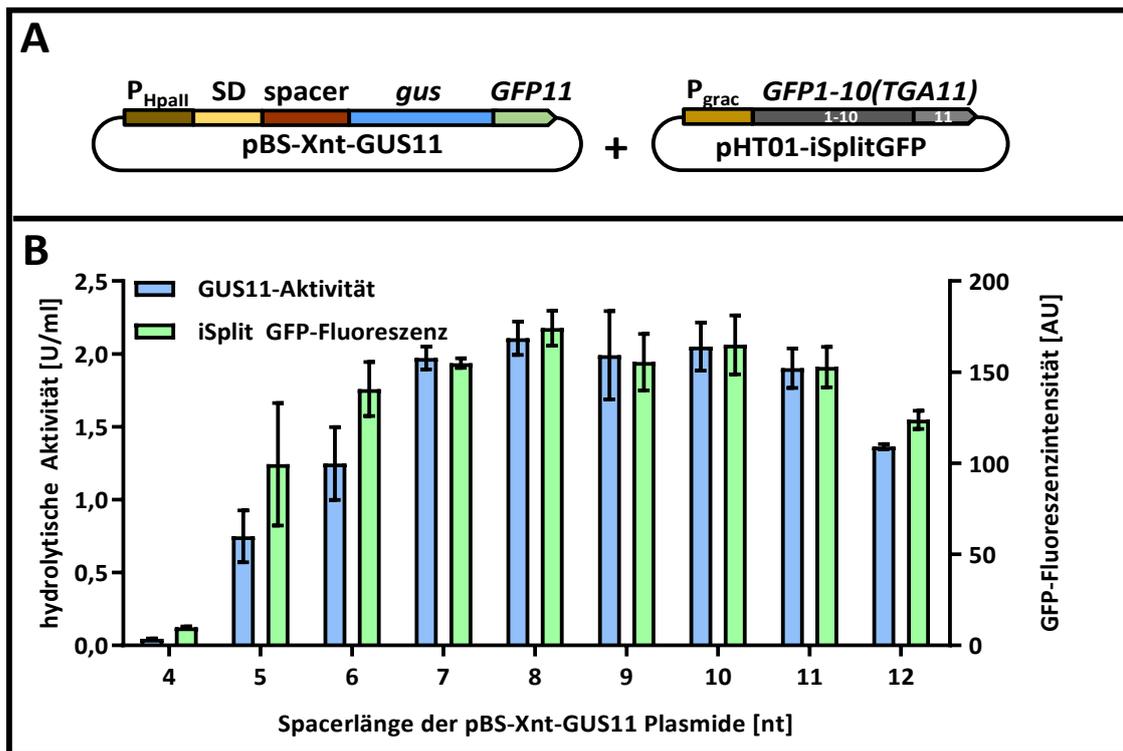


Abb. 3.6: Die graduelle GUS11-Produktion konnte mit dem iSplit GFP Assay nachgewiesen werden. **A** Schematische Darstellung der genutzten Plasmide. Die DNA-Abschnitte sind nicht maßstabsgetreu abgebildet. **B.** *subtilis* DB430 wurde mit einem Plasmid der pBS-Xnt-GUS11 Plasmidserie und zusätzlich dem Plasmid pHT01-iSplitGFP transformiert. Die Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 trägt neben dem Gen zur GUS11-Produktion den starken konstitutiven P_{HpaI} Promotor und variierende RBS-Spacer (spacer; von 4 bis 12 nt, wie durch Xnt im Plasmidnamen angegeben) zwischen der SD-Sequenz und dem *gus11* Startcodon. Das pHT01-iSplitGFP Plasmid trägt neben dem starken induzierbaren P_{grac} Promotor das Gen für das Detektorderivat GFP1-10(TGA11). Die Expression des Detektors wurde zu Kultivierungsbeginn mit Zugabe von 1 mM IPTG induziert. **B** Auf eine OD_{580nm} von 1 normierte enzymatische Aktivität der GUS11 mit pNPG (blau) und entsprechende iSplit GFP-Fluoreszenzintensität (grün) der unterschiedlichen RBS-Spacervarianten. Alle Messungen wurden in biologischer und technischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mittelwerte. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der biologischen Triplikate. Modifiziert nach Lenz et al., 2021. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0) geschützt.

Mit beiden Nachweismethoden konnte die graduelle GUS11-Produktion detektiert werden. Sowohl bei der Aktivitätsmessung als auch beim iSplit GFP Assay zeigte die 4 nt Variante das geringste Signal ($0,05 \pm 0,002$ U/ml; $9,82 \pm 0,56$ AU) und die Variante mit einem 8 nt langen RBS-Spacer das höchste ($2,11 \pm 0,11$ U/ml; $174,10 \pm 9,54$ AU). Die Messdaten beider Methoden zum Nachweis der produzierten GUS11-Menge zeigten eine starke Korrelation ($r=0,96$; $R^2=0,91$; Abb. 7.1C im Anhang), wie es auch bereits für den *in vitro* Split GFP Assay gezeigt werden konnte (Abb. 3.3; Abb. 7.1A im Anhang). Der iSplit GFP Assay bietet sich daher als geeignete aktivitätsunabhängige *in vivo* Methode zum cytoplasmatischen Proteinnachweis an.

3.1.5 Der iSplit GFP Assay eignet sich als Methode zur *online* Überwachung der Proteinproduktion

Nachdem mit der Nutzung des pHT01-iSplitGFP Plasmides die Etablierung einer aktivitätsunabhängigen *in vivo* Nachweismethode für intrazelluläre Proteine in *B. subtilis* durchgeführt werden konnte (Abb. 3.6), wurde als nächstes geprüft, ob sich der iSplit GFP Assay auch für die *online* Überwachung der Zielproteinproduktion während der Kultivierung eignet. Dafür wurde *B. subtilis* DB430 mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 oder dem pBSMul1 Leervektor als Negativkontrolle und zusätzlich dem pHT01-iSplitGFP mittels natürlicher Kompetenz transformiert (Kapitel 2.4.5). Für die *online* Überwachung des Wachstums und der über den iSplit GFP Assay erzeugten Fluoreszenz wurden die Transformanten in einem BioLector® Mikrobioreaktorsystem in FlowerPlates für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Für die Expression des *GFP1-10(TGA11)* wurde zu Kultivierungsbeginn die Kultur mit 1 mM IPTG supplementiert. Als zusätzliche Kontrolle für die Induzierbarkeit des P_{grac} Promotors wurde ein *B. subtilis* DB430-Stamm, welcher die Plasmidkombination pBS-8nt-GUS11/pHT01-iSplitGFP trug, zu Beginn der Kultivierung nicht induziert (Abb. 3.7A). Als Validierung der Fluoreszenzsignale wurde nach der Kultivierung zusätzlich die hydrolytische Aktivität der Kulturen mit *pNPG* gemessen (Kapitel 2.6.5; Abb. 3.7B).

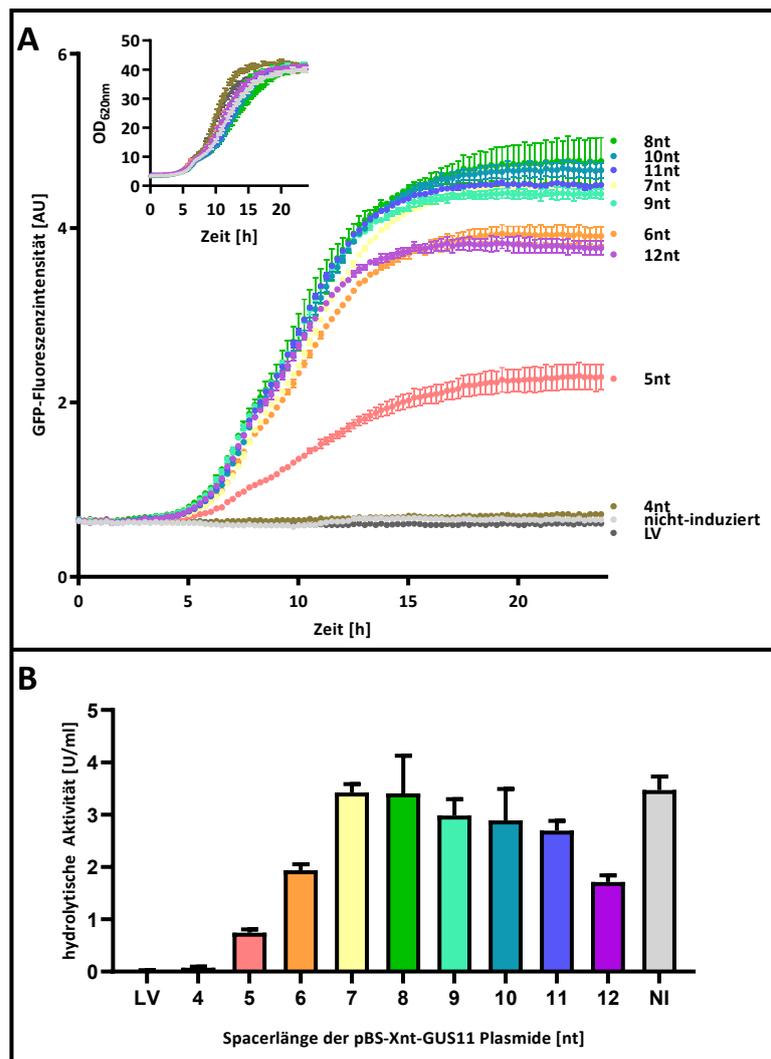


Abb. 3.7: Mit dem iSplit GFP Assay kann die GUS11-Produktion zeitaufgelöst betrachtet werden. Analysiert wurden verschiedene *B. subtilis* DB430-Stämme, welche mit einem Plasmid der Serie pBS-Xnt-GUS11 für die konstitutive Produktion der GUS11 mit unterschiedlich langen RBS-Spacern (spacer; 4-12 Nukleotide, zu sehen am Xnt im Plasmidnamen) unter der Kontrolle des P_{HpaII} Promotors und mit dem Plasmid pHT01-iSplitGFP für die Koproduktion des Detektors transformiert wurden. Die Detektorproduktion wurde direkt zu Beginn der Kultivierung mit 1 mM IPTG induziert. Als Negativkontrollen für den iSplit GFP Assay wurden der pBSMul1 Leervektor (LV) und ein nicht induzierter pBS-8nt-GUS11 exprimierender Stamm mitkultiviert (NI). **A** Kultiviert wurde für 24 Stunden bei 30°C und 1100 UpM im BioLector® Mikrobioreaktorsystem. Das Wachstum wurde über die Lichtstreuung bei $\lambda = 620$ nm bestimmt (Einschub) und die iSplit GFP-Fluoreszenz über den eYFP-Filter bestimmt. **B** Auf eine OD_{580nm} von 1 normierte hydrolytische Aktivitäten des Zellysats mit pNPG nach der Kultivierung. Es wurde in biologischer Dreifachbestimmung kultiviert und zusätzlich wurde bei der Aktivitätsbestimmung in technischer Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der biologischen Replikate an. Modifiziert nach Lenz et al., 2021. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0) geschützt.

Da alle Stämme ein ähnliches Wachsverhalten aufwiesen (Abb. 3.7, Einschub), konnten die gemessenen iSplit GFP-Fluoreszenzdaten direkt miteinander verglichen werden. Die GUS11-Produktion erreichte bei allen Stämmen nach etwa 15-stündiger Kultivierung ein Plateau, was zeitgleich der Eintritt in die stationäre Wachphase war. Dies wird darauf zurückzuführen sein, dass der hier verwendete P_{HpaII} Promotor nur in der exponentiellen Wachphase aktiv ist (Guan

et al., 2016). Wie erwartet, unterschieden sich die messbaren Fluoreszenzintensitäten abhängig von dem verwendeten RBS-Spacer und bestätigten damit die vorherigen Ergebnisse (Abb. 3.3; Abb. 3.6). Die Kontrolle mit 8 nt langem RBS-Spacer aber nicht induzierter Detektorexpression wies am Ende der Kultivierung eine Fluoreszenz von $0,66 \pm 0,01$ AU bei einer hydrolytischen Aktivität von $3,47 \pm 0,26$ U/ml auf. Im Vergleich dazu zeigte das induzierte Pendant mit $3,40 \pm 0,72$ U/ml eine ähnliche Aktivität bei einer achtfach höheren Fluoreszenz von $4,77 \pm 0,27$ AU auf. Hiermit konnte gezeigt werden, dass das basale Expressionslevel des P_{grac} Promotors etwa 13 % des induzierten Expressionslevels aufwies. Negativ regulierte induzierbare Promotorsysteme wie der P_{grac} Promotor, zeigen meist ein erhöhtes basales Expressionslevel (Siegele et al., 1997, Rosano et al., 2014). Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten bedingt durch die verschiedenen RBS-Spacer korrelierten mit den gemessenen hydrolytischen Aktivitäten ($r=0,92$; $R^2=0,92$; Abb. 7.1D im Anhang). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der iSplit GFP Assay sich nicht nur als *in vivo* Nachweismethode für intrazelluläre Proteine eignet, sondern auch als Methode zur *online* Überwachung der Proteinproduktion genutzt werden kann.

3.1.6 Mit dem iSplit GFP Assay kann die Zielproteinproduktion auf Einzelzellebene analysiert werden

Populationsheterogenität tritt in allen biologischen Kultivierungs- und Produktionsprozessen auf (Heins et al., 2018). Bei der Verwendung von Plasmiden für die rekombinante Produktion in *B. subtilis* ist die Wahrscheinlichkeit jedoch noch einmal deutlich erhöht, da zum einen *B. subtilis* aufgrund seiner guten Anpassbarkeit an Umwelteinflüsse verschiedenste metabolische Zustände einnehmen (Dubnau, 2010, Shank et al., 2011) und zum anderen bei der Verwendung von Expressionsplasmiden die Kopien- und damit einhergehend die Zielgenanzahl pro Zelle deutlich variieren kann (Løbner-Olesen, 1999, Lutz et al., 1997).

Daher kann die Analyse der Populationsheterogenität sinnvoll sein. Hierzu können Einzelzellanalysemethoden, wie die Durchflusszytometrie oder die Kultivierung in mikrofluidischen Kammern mit mikroskopischen Untersuchungen in Kombination mit Fluoreszenzreportern genutzt werden (Ambriz-Aviña et al., 2014, Davey et al., 2003, Yin et al., 2012, Dusny et al., 2015, Heins et al., 2018). Der iSplit GFP Assay hat als fluoreszenzbasierte Methode ebenfalls das Potenzial als Biosensor für die Analyse der von der Zielproteinproduktion ausgelösten Populationsheterogenität genutzt zu werden. Daher wurden die im BioLector® kultivierten und bereits als Zellsuspension untersuchten Kulturen aus Kapitel 3.1.5 für eine Durchflusszytometeranalyse verwendet. Zur Unterscheidung zwischen

Zellen und Zelltrümmern bzw. Zellaggregaten wurden die Proben zunächst hinsichtlich ihrer Lichtstreuungseigenschaften untersucht (Kapitel 2.7.2; Abb. 7.2 im Anhang), bevor ein *gate* zur Analyse der Zellen gewählt wurde. Danach wurden jeweils 10.000 Zellen hinsichtlich ihrer spezifischen iSplit GFP-Fluoreszenz analysiert (Abb. 3.8).

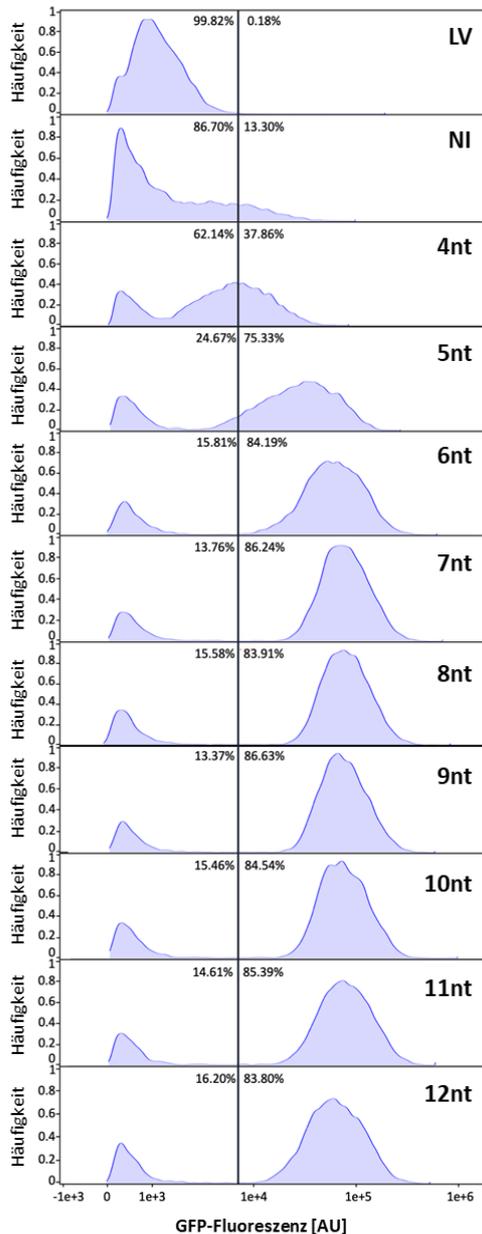


Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenzverteilung einzelner *B. subtilis*-Zellen. Die hier untersuchten *B. subtilis* DB430-Stämme wurden mit einem Plasmid der pBS-Xnt-GUS11 Serie beziehungsweise dem pBSMul1 Leervektor (LV) und zusätzlich mit dem Plasmid pHT01-iSplitGFP transformiert. Auf den Plasmiden der pBS-Xnt-GUS11-Serie liegt das GUS11-kodierende Gen unter Kontrolle des starken konstitutiven P_{HpaII} Promotors. Die Translationseffizienz des Zielgens wird durch die unterschiedlich langen RBS-Spacer von 4 bis 12 nt moduliert. Der pHT01-iSplitGFP kodiert für ein Detektorderivat zum aktivitätsunabhängigen Nachweis von Zielproteinen, welche mit dem elften β -Faltblatt des GFP markiert sind. Der Detektor steht unter der Kontrolle des starken induzierbaren P_{grac} Promotors. Kultiviert wurden die hier analysierten Stämme bei 30°C und 1100 UpM in oLB-Medium in einem BioLector® Mikrobioreaktorsystems für 24 Stunden. Die Expression des Detektors wurde zu Beginn der Kultivierung mit 1 mM IPTG induziert. Die einzige Ausnahme bildet hier ein Stamm mit dem Plasmid pBS-8nt-GUS11, welcher als Negativkontrolle fungierte und nicht induziert wurde (NI). Proben aus der stationären Wachstumsphase der Kulturen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen wurden entsprechend ihres FSC und SSC Signals *gated*, um Zelltrümmer und Zellaggregate zu exkludieren (Abb. 7.2 im Anhang; Kapitel 2.7.2). Die iSplit GFP-Fluoreszenzintensität jeder Zelle wurde gemessen und gegen die Häufigkeit der Signalintensitäten aufgetragen. Die Verhältnisse der fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen, welche durch eine Linie getrennt wurden, sind in jedem Graphen in Prozent dargestellt. Alle Graphen repräsentieren beispielhaft eine Analyse einer biologischen Dreifachbestimmung. Modifiziert nach Lenz et al., 2021. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0) geschützt.

Die Fluoreszenzintensitäten der im Durchflusszytometer analysierten Proben ähnelten den Fluoreszenzmessungen der zuvor analysierten Zellsuspensionen (Abb. 3.7). Mit der Verlängerung der RBS-Spacer von 4 auf 9 nt nahmen auch die Gesamtfluoreszenzintensitäten der individuellen Populationen zu, bis ein Plateau bei einer RBS-Spacerlänge von 7 nt erreicht wurde. Ab einer RBS-Spacerlänge von über 9 nt nahm die Fluoreszenzintensität und der Anteil an fluoreszierenden Zellen von der Gesamtheit wieder ab. Bei der Betrachtung der Verteilung der Fluoreszenzhelligkeiten einzelner Zellen in der untersuchten Population fiel auf, dass ab

einer RBS-Spacerlänge von 6 nt 75-85 % der Zellen ähnlich stark fluoreszierten, was dafür spricht, dass eine stärkere *gus11*-Expression nicht in einer erhöhten Populationsheterogenität mündet. Zusätzlich dazu konnte gemessen werden, dass dauerhaft mindestens etwa 15 % der Zellen trotz Induktion der Detektorexpression und zunehmender Translation nicht oder nur gering fluoreszierten. Ob die Signale bei den Zellen, die nur geringe oder keine Fluoreszenzintensitäten zeigten, auf ein niedriges Level des Detektors zurückzuführen waren, kann anhand der gewonnenen Daten jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Varianten mit sehr kurzen RBS-Spacer von nur 4 oder 5 nt, welche auch die geringste Translationsinitiationsrate (TIR) aufwiesen (Volkenborn et al., 2020), zeigten durch die breite Verteilung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu allen anderen Varianten erhöhte Produktionsheterogenität. Die unterschiedlichen TIR wurden kürzlich dadurch erklärt, dass bei nicht optimalen RBS-Spacern die mRNA rigide Sekundärstrukturen annimmt, die etwa durch die Maskierung der RBS die Ribosomenbindung beeinflussen (Volkenborn et al., 2020, Vellanoweth et al., 1992). Die Heterogenität könnte dadurch erklärt werden, dass die Belegung der mRNA mit Ribosomen bei geringen TIR unwahrscheinlicher ist, was wiederum zu unterschiedlich ausgeprägter mRNA-Degradation führen kann (Vargas-Blanco et al., 2020, Deana et al., 2005). Diese Annahme wird dadurch gestärkt, dass bereits Unterschiede in der mRNA-Menge für unterschiedliche RBS-Spacer festgestellt werden konnten (Volkenborn et al., 2020). Zusätzlich zu der messbaren Heterogenität konnte eine verminderte GUS11-Produktion durch die generell geringeren Fluoreszenzintensitäten bei Varianten mit kurzen RBS-Spacern im Vergleich zu den anderen Varianten festgestellt werden, wie es bereits bei der Messung der Zellsuspension ersichtlich war (Abb. 3.7). Der Stamm, welcher das Plasmid pBS-8nt-GUS11 trug und das höchste GUS11-Produktionslevel aufwies (Abb. 3.6), zeigte hierbei die geringste Heterogenität. Die Daten zeigten, dass sich mithilfe des iSplit GFP Assays GUS11-Produktionsheterogenitäten auf Einzelzellebene bestimmen lassen. Hierbei scheint Produktionsheterogenität eine größere Rolle bei Varianten mit geringen TIR zu spielen. Für ein breites Spektrum der akkumulierten GUS11-Mengen konnte das hier etablierte iSplit GFP-System zuverlässig die Zielproteine detektieren und so Unterschiede in den individuellen GUS11-Leveln darstellen. Für nähere Analysen der Produktionsheterogenität wurden die Transformanten ausgewählt, die die höchste (4nt-GUS11) bzw. die niedrigste Populationsheterogenität (8nt-GUS11) aufwiesen, um durch mikrofluidische Einzelzellanalyse in Kombination mit Mikroskopie genauer untersucht zu werden. Durch Zeitrafferaufnahmen kann die intrazelluläre Verteilung des Zielproteins und ein möglicher Effekt auf die Zellmorphologie untersucht werden. Vergleichend wurden sowohl *B. subtilis* DB430 mit den

beiden Leervektoren pBSMul1 und pHT01 (Negativkontrolle) als auch mit dem pBSMul1 Leervektor und dem *sfGFP*-kodierenden Plasmid pHT01-*sfGFP*-11 transformiert (Positivkontrolle; Kapitel 2.4.5) und ebenfalls analysiert. Die Kulturen wurden in einem mikrofluidischen System kultiviert und hinsichtlich ihres Wachstums, der Zellmorphologie, der GUS11-Produktion durch die iSplit GFP Assay Fluoreszenz und auch zusätzlich hinsichtlich möglicher toxischer Effekte durch die Verwendung des iSplit GFP Assays mit dem Propidiumiodid (PI)-Assay untersucht (Kapitel 2.7.1; Abb. 3.9).

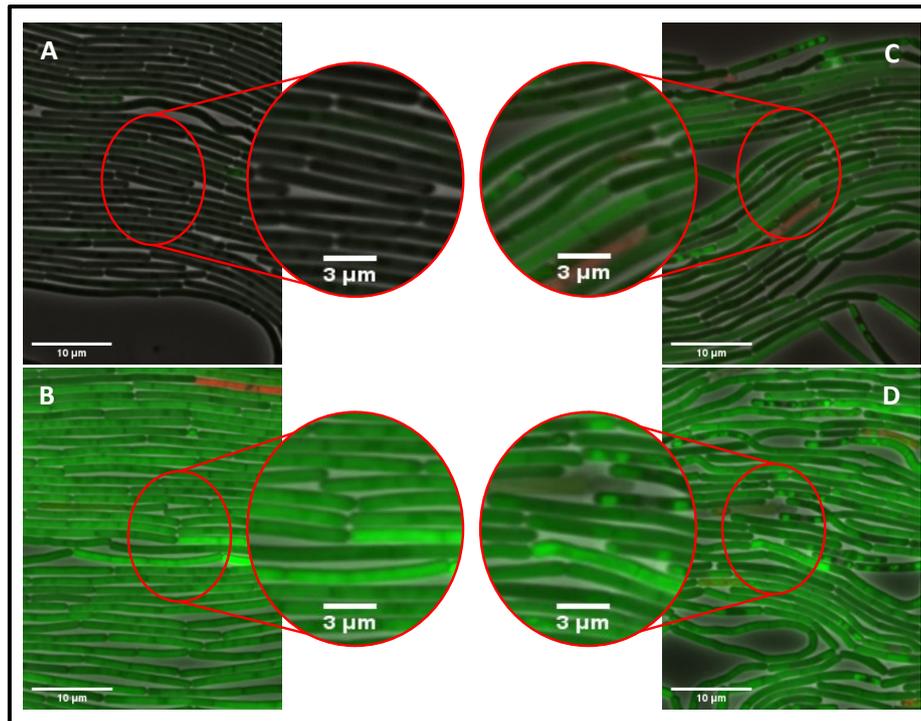


Abb. 3.9: Cytoplasmatische Verteilung der GUS11 in *B. subtilis*-Zellen nachgewiesen über den iSplit GFP Assay. Die mikrofluidischen Kammern wurden bei 30°C inkubiert und kontinuierlich mit frischem oLB-Medium versorgt. Das oLB-Medium wurde mit 1 μ M Propidiumiodid für die visuelle Unterscheidung von lebenden und toten Zellen und mit 1 mM IPTG zur Induktion der Detektor bzw. *sfGFP*-Expression angereichert. Das Wachstum wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie verfolgt, die GUS11 und *sfGFP*-Produktion wurde mit einem GFP-Filter visualisiert und die Unterscheidung zwischen vitalen und lysierten *B. subtilis*-Zellen wurde mit einem mCherry-Filter für den Propidiumiodid-Assay durchgeführt. Alle drei Kanäle wurden übereinandergelegt und für eine bessere Analyse an repräsentativen Stellen vergrößert. Die untersuchten Zellen wurden entweder **A** mit den beiden Leervektoren pBSMul1 und pHT01 oder **B** mit dem Leervektor pBSMul1 und dem *sfGFP*-kodierenden Plasmid pHT01-*sfGFP* transformiert und hier als Kontrollen genutzt. Zusätzlich wurden noch Transformanden kultiviert, welche den pHT01-iSplitGFP und entweder **C** den pBS-4nt-GUS11 oder **D** den pBS-8nt-GUS11 trugen. Entnommen aus Lenz et al., 2021. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0) geschützt.

Während der exponentiellen Wachstumsphase zeigten alle *B. subtilis*-Zellen das bekannte filamentöse Aussehen (Li et al., 2018) und ein ähnliches Wuchsverhalten (besser zu sehen in den Videos 1-4 aus der Publikation Lenz et al., 2021). Aus diesem Grund lässt sich festhalten, dass im mikrofluidischen System negative Effekte des iSplit GFP Assays auf das Zellwachstum und deren Morphologie gar nicht oder nur im geringen Maße auftraten. Zusätzlich erlaubte die Nutzung des PI-Assays lebende und tote Zellen zu unterscheiden. Ein negativer Effekt der

sfGFP-Expression auf die Zellviabilität konnte ausgeschlossen werden, da bei der Positiv- und Negativkontrolle etwa gleich viele Zellen ein PI-Signal aufwiesen (Abb. 3.9A+B; ebenfalls in den Videos 1+2 aus Lenz et al., 2021 zu sehen). Bei der Expression der 8 nt Variante konnte im Vergleich mit der 4 nt Variante eine leicht erhöhte Anzahl PI-positiver Zellen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass der iSplit GFP Assay in Kombination mit einer hohen Zielproteinproduktion einen Einfluss auf die Zellviabilität haben kann (Abb. 3.9C+D; Videos 3+4 aus Lenz et al., 2021). Die Negativkontrolle zeigte, wie erwartet, keine *sfGFP*-Fluoreszenz (Abb. 3.9A; Video 1 aus Lenz et al., 2021). Bei der Positivkontrolle war die *sfGFP*-Fluoreszenz in den betrachteten Zellen überwiegend homogen innerhalb des Cytosols verteilt, in einigen Fällen war lediglich eine leichte Populationsheterogenität sichtbar (Abb. 3.9B, Video 2 aus Lenz et al., 2021). Wie durch die durchflusszytometrische Untersuchung bereits aufgezeigt (Abb. 3.8), führte die pBS-8nt-GUS11-vermittelten hohen Akkumulationslevel der GUS11 auch hier zu einer deutlich höheren Fluoreszenz in Kombination mit einer geringeren Populationsheterogenität im Vergleich zur 4 nt Variante. Auffallend war, dass im Vergleich zu den *sfGFP*-produzierenden Zellen die Fluoreszenz des iSplit GFP Assays teilweise an einzelnen Stellen wie den Zellpolen innerhalb des Cytosols akkumulierte (Abb. 3.9C+D; Videos 3+4 aus Lenz et al., 2021). Da aus *E. coli*-Arbeiten bekannt ist, dass der Split GFP Assay zur *in vivo* Detektion von Proteinaggregaten genutzt werden kann (Cabantous et al., 2004, Cabantous et al., 2006), liegt die Vermutung nahe, dass die hier sichtbaren distinkten Regionen mit höherer Fluoreszenz möglicherweise aggregiertes GUS11 darstellten. Solche Aggregate bilden zum Teil Einschlusskörperchen, von denen bekannt ist, dass sie sich in *E. coli* an den Zellpolen befinden (Lindner et al., 2008, Marston, 1986). Dies schien auch hier zutreffend zu sein. Interessanterweise scheinen die aggregierten Proteine zumindest teilweise ihre funktionellen Eigenschaften beizubehalten, da für die 8 nt Variante die höchsten Enzymaktivitäten messbar waren (Abb. 3.6), während viele andere Proteine in Einschlusskörperchen inaktiv vorliegen (Clark, 2001). Abschließend konnten die Ergebnisse der GUS11-Produktion und der Fluoreszenzausbeute der Zellsuspension auch durch die Einzelzellanalysen bestätigt werden (Abb. 3.6). Somit konnte abschließend gezeigt werden, dass der iSplit GFP Assay sich nicht nur für die Proteindetektion in Zellsuspensionen, sondern auch für die Analyse von etwa der Heterogenität auf Einzelzellebene eignet.

3.1.7 Resümee des iSplit GFP Assays

Der Nachweis und die relative Quantifizierung von rekombinant produzierten Proteinen sind für biotechnologische Prozesse von zentraler Bedeutung. Oft werden dafür aktivitätsbasierte Nachweismethoden in Kombination mit photometrischen oder fluorometrischen Reagenzien verwendet, wie es beispielsweise von Lipasen (Jaeger et al., 2014), Proteasen (Kasana et al., 2011) oder β -Lactamasen (Zyk, 1972) bekannt ist. Da oft für die Optimierung von Produktionsprozessen viele Varianten untersucht werden müssen, sollten solche Nachweismethoden kosteneffizient, simpel und im Idealfall auch im Hochdurchsatz anwendbar sein. Wie jedoch der komplizierte und schwierige Nachweis von Cellulasen oder β -Glukanasen (Gusakov et al., 2011) zeigt, ist dies nicht für alle Enzyme und schon gar nicht für nicht-enzymatische Zielproteine möglich. Diese müssen bisweilen mit den komplexen und kosten- bzw. zeitintensiven Methoden wie dem enzymgebundenen Immunosorbent-Assay (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA; Clark et al., 1986) oder der SDS-PAGE (Laemmli, 1970) quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde der iSplit GFP Assay als *in vivo* Methode zur Zielproteindetektion als aktivitätsunabhängige Alternative etabliert. Bei dieser Methode wird das nur 16 Aminosäuren umfassende elfte β -Faltblatt des *sfGFP* mit einem kurzen Peptidlinker C-terminal an das Zielprotein fusioniert (Cabantous et al., 2004, Cabantous et al., 2006, Santos-Aberturas et al., 2015, Knapp et al., 2017, Bakkes et al., 2021). In einem ersten Schritt konnte zunächst gezeigt werden, dass dieser kurze Protein-*tag* nur einen minimalen Einfluss auf die Aktivität des Zielproteins hat (Abb. 3.3B; Knapp et al., 2017, Bakkes et al., 2021, Santos-Aberturas et al., 2015), welcher einen deutlichen Vorteil gegenüber großen, sterisch beeinflussenden *tags* bietet. Zusätzlich bot der Split GFP Assay, der bisher nur als Methode zum *in vitro* Nachweis von sekretierten Proteinen in *B. subtilis* genutzt wurde (Knapp et al., 2017) auch die Möglichkeit des *in vitro* Nachweises einer intrazellulär produzierten β -Glukuronidase (Abb. 3.3), wie er bereits in *E. coli* genutzt wird (Santos-Aberturas et al., 2015). Mit der Koproduktion des Zielproteins und des Detektors konnte aus der *in vitro* Methode der *in vivo* Split GFP Assay für intrazelluläre Zielproteine (iSplit GFP Assay) entwickelt werden, welcher zusätzlich zur Proteinmengenbestimmung (Abb. 3.6) auch als Biosensor für die *online* Betrachtung der Zielproteinproduktion (Abb. 3.7) oder für Einzelzellanalysen wie die Durchflusszytometrie (Abb. 3.8) oder die Mikrofluidik (Abb. 3.9) genutzt werden kann. Der iSplit GFP Assay Biosensor unterscheidet sich stark von anderen Biosensoren. So gibt es Biosensoren, welche spezifisch für die Detektion von einem Zielmolekül oder -protein entwickelt wurden (Binder et al., 2012, Mustafi et al., 2012, Yeom et al., 2018) oder die durch die Fusionen ganzer Proteine mit eigenen Nachweismethoden wie GFP oder die Glutathion-S-

Transferase zwar Zielprotein unspezifisch sind, jedoch gleichzeitig einen großen Einfluss auf die Zielproteinausbeute, -stabilität und -aktivität haben können (Snapp, 2005, Waldo et al., 1999, van Rossum et al., 2013, Young et al., 2012). Diese Limitierungen können durch die Verwendung des iSplit GFP Systems vermieden oder verringert werden, was zu einer Prozessoptimierung führt. Auch wenn in dieser Studie hauptsächlich im MTP-Maßstab gearbeitet wurde, ist durch die Möglichkeit der Einzelzellanalyse mit dem iSplit GFP Assay (Kapitel 3.1.6) auch eine Nutzung in Kombination mit der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse mittels FACS denkbar, wie es bereits bei verschiedenen Biosensoren angewandt werden konnte (Schallmeyer et al., 2014, van Rossum et al., 2013, Mahr et al., 2016, Eggeling et al., 2015). Die damit theoretisch messbare Anzahl an Varianten kann dadurch von 10^6 auf bis zu 10^9 gesteigert werden (Tracy et al., 2010). Die Detektion von intrazellulären Fluoreszenzspots bei der mikrofluidischen Analyse der GUS11-Produktion (Abb. 3.9D) ließ vermuten, dass der iSplit GFP Assay ähnlich zu seinem Gegenstück in *E. coli* (Cabantous et al., 2006) Einschlusskörperchen visualisieren könnte. Einschlusskörperchen werden auf der einen Seite meist mit dem kompletten Funktionsverlust des aggregierten Proteins assoziiert und sollten daher bei der (rekombinanten) Proteinproduktion vermieden werden (Clark, 2001). Aus der Literatur ist bekannt, dass Proteine auch in ihrer katalytisch aktiven Form kosteneffizient in Einschlusskörperchen immobilisiert werden können (Jäger et al., 2018, Jäger et al., 2019). Die Nutzung von immobilisierten Enzymen ist durch die mit der Immobilisierung einhergehenden erhöhten Stabilität und dem möglichen Recycling von großer biotechnologischer Relevanz (Ölçücü et al., 2021). Diese einfach durchzuführende Visualisierung von Einschlusskörperchen beim iSplit GFP Assay wäre daher für die (rekombinante) Proteinproduktion von großem Interesse. Deswegen ist der iSplit GFP Assay für die intrazelluläre Zielproteinproduktion in *B. subtilis* durch seine vielseitige Einsetzbarkeit von großer Bedeutung.

Zusammenfassung

Ein Split GFP-basiertes *in vivo* Nachweissystem für cytosolische Proteine in *B. subtilis*

- Der Split GFP Assay konnte für den *in vitro* Nachweis von intrazellulär produzierter GUS11 genutzt werden.
- Die Koproduktion der GUS11 mit *sfGFP* hatte keinen negativen Einfluss auf die graduelle GUS11-Produktion.
- Der Detektor GFP1-10(TGA11) konnte in zu *sfGFP* vergleichbaren Mengen produziert werden. Der Detektor ähnelt auf DNA- und mRNA-Ebene *sfGFP* durch den Einbau eines Stoppcodons nach dem zehnten β -Faltblatt, aber nach der Translation dem trunkierten GFP1-10.

- Durch Koproduktion des neuen Detektors GFP1-10(TGA11) mit der GUS11 konnte die Zielproteinproduktion *online* betrachtet und *in vivo* ausgelesen werden.
- Die GUS11-Produktion konnte durch den iSplit GFP Assay auf Einzelzellebene analysiert werden.

Publikation:

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 dieser Arbeit sind in der Publikation „The iSplit GFP assay detects intracellular recombinant proteins in *Bacillus subtilis*“ **Patrick Lenz**, Fabienne Hilgers, Alina Burmeister, Leonie Zimmermann, Kristina Volkenborn, Alexander Grünberger, Dietrich Kohlheyer, Thomas Drepper, Karl-Erich Jaeger, Andreas Knapp (2021), *Microb Cell Fact* 20, 174, <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01663-7> veröffentlicht.

Die Publikation steht unter der Creative-Common-Lizenz BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), weshalb die darin enthaltenen Abbildungen in (veränderter) Form genutzt werden dürfen.

3.2 Kombinierte Nachweismethoden zur Analyse sekretierter Proteine in *B. subtilis*

B. subtilis ist einer der bekanntesten in der industriellen Biotechnologie genutzten Organismen für die Sekretion von Zielproteinen (Schallmey et al., 2004). Einer der größten Vorteile dieser Produktionsweise ist die Einsparung von Kosten im *Downstream*-Prozess von 50 bis 80 % dadurch, dass Reinigungsschritte wie Zellyse und die Abtrennung von Zelltrümmern und intrazellulären Proteinen entfallen (Labrou, 2014). Da vor allem die heterologe Sekretion in ausreichenden Mengen nicht trivial ist, müssen viele gerichtete und ungerichtete Optimierungskampagnen wie etwa die initialen Signalpeptid-Screenings zu Beginn der Etablierung eines neuen Zielproteins durchgeführt werden (Brockmeier et al., 2006a, Degering et al., 2010, Freudl, 2018). Da in solchen Kampagnen oft eine Vielzahl an verschiedenen Varianten getestet werden muss, ist die Nutzung von im Hochdurchsatz einsetzbaren Nachweismethoden nahezu obligatorisch.

Eine mögliche Nachweismethode in dem Zusammenhang ist der in dieser Arbeitsgruppe entwickelte Split GFP Assay (Knapp et al., 2017). Bei der *in vitro* Anwendung für sekretierte Proteine wird der zellfreie Kulturüberstand, in welchem sich das Zielprotein mit GFP11-*tag* befindet, mit dem Detektor vermischt und für einige Stunden zur holo-GFP Rekonstitution inkubiert. Der Split GFP Assay ist zwar eine einfache und auch im Hochdurchsatz einsetzbare Methode (Bakkes et al., 2021, Knapp et al., 2017), jedoch ist dieser durch die *in vitro*

Rekonstitution des holo-GFP auch zeitintensiv. Zusätzlich wird beim Split GFP Assay wie bei allen anderen Zielproteinnachweismethoden die zelluläre Stressantwort auf die rekombinante Sekretion nicht berücksichtigt.

Daher war das Ziel die Entwicklung einer *in vivo* Anwendungsmöglichkeit des Split GFP Assays sowie die Etablierung eines Sekretionsstress-Biosensors basierend auf dem in dieser Arbeit genutzten Stamm *B. subtilis* DB430, um in einem nächsten Schritt beide Methoden zu einem umfassenden *in vivo* Nachweissystem für sekretierte Zielproteine zu kombinieren (Abb. 3.10).

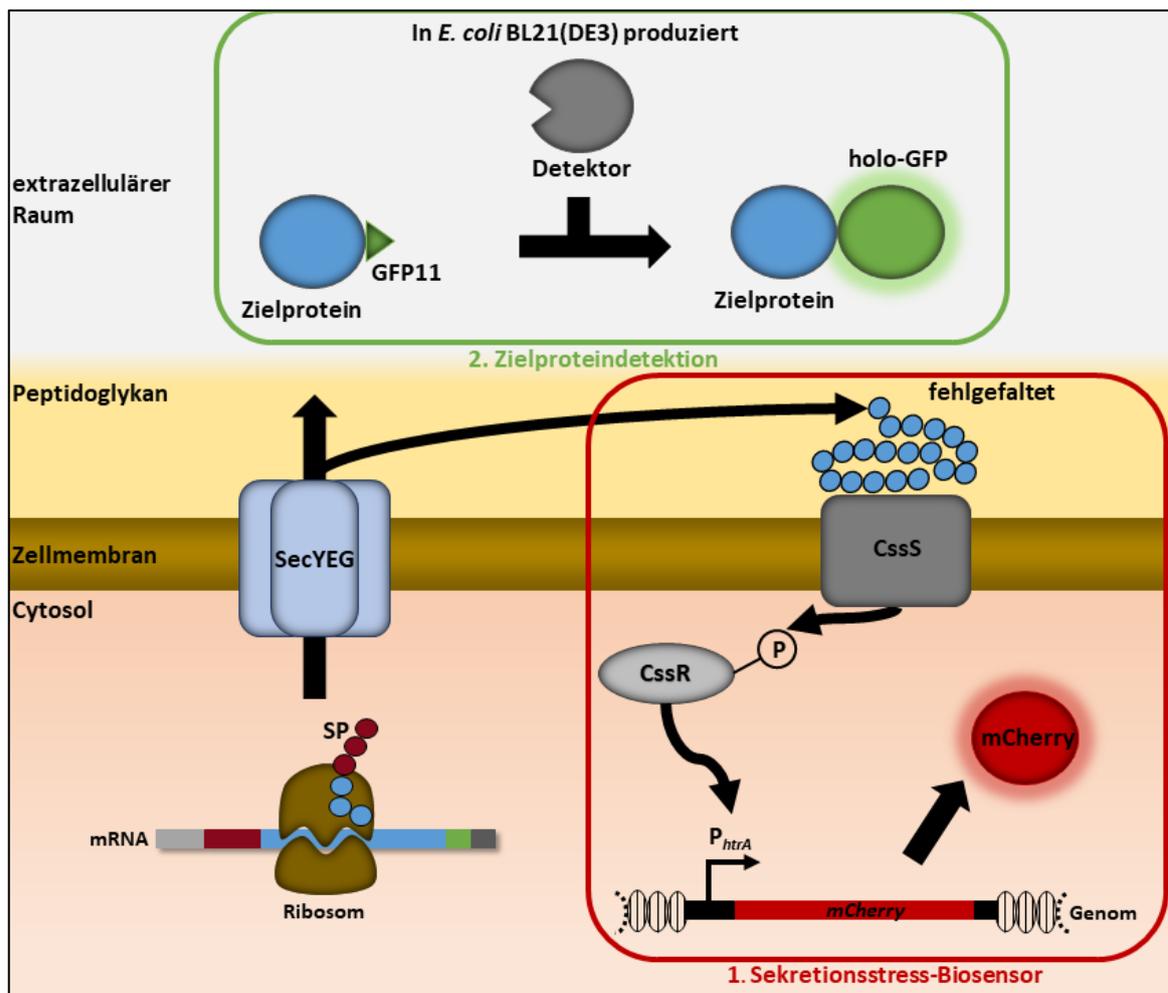


Abb. 3.10: Prinzip des kombinierten Nachweissystems für sekretierte Proteine in *B. subtilis*. Die kombinierte Analyse von sekretierten Proteinen in *B. subtilis* wird durch die Kombination von zwei Einzelsystemen ermöglicht. **1** Ein Sekretionsstress-Biosensor zum Auslesen der zellulären Stressantwort auf die Sekretion des Zielproteins durch einen Fluoreszenzreporter. Dieser Biosensor basiert auf dem CssRS Zweikomponentensystem. Der Sensor CssS erkennt sekretiertes, fehlgefaltetes Protein am Übergang zwischen Zellmembran und Peptidoglykan und phosphoryliert daraufhin seinen Regulator CssR. Dies führt im Wildtyp zur Induktion der Transkription der Proteasegene *htrA* und *htrB*, welche die Proteinaggregate degradieren, um die Integrität der Zellmembran aufrechtzuerhalten. Dieser Prozess wird Sekretionsstress genannt. Der Sekretionsstress kann durch die genomische Integration eines Fluoreszenzreportergens (*mCherry*) unter Kontrolle des P_{htrA} Promotors spektrometrisch ausgelesen werden. **2** Ein Split GFP-basierter minimal invasiver *in vivo* Nachweis von sekretierten Proteinen durch die Zugabe von in *E. coli* BL21(DE3) extern produzierten Detektor während der Kultivierung.

Der Sekretionsstress-Biosensor basiert auf dem C_{ss}RS Zweikomponentensystem, welches ein Qualitätskontrollsystem für sekretierte Proteine in *B. subtilis* ist (Hyyryläinen et al., 2001). Dieses Kontrollsystem ist in Prokaryoten hoch konserviert und konnte in gleicher oder ähnlicher Form bereits in *E. coli* und *C. glutamicum* identifiziert werden (Danese et al., 1995, Jurischka et al., 2020). Die Histidinkinase C_{ss}S ist ein Transmembranprotein und kann fehlgefaltetes sekretiertes Protein am Übergang zwischen Zellmembran und Peptidoglykan erkennen, welches die Integrität der Zellmembran gefährden kann. C_{ss}S phosphoryliert daraufhin intrazellulär den Antwortregulator C_{ss}R. In phosphorylierter Form kann C_{ss}R an die Promotorregionen der Proteasegene *htrA* und *htrB* binden und deren Transkription induzieren. Die dadurch vermehrt produzierten Proteasen HtrA und HtrB degradieren anschließend die fehlgefalteten Proteinaggregate. Die induzierte Expression von *htrA* und *htrB* durch das C_{ss}RS System wird auch zelluläre Sekretionsstressantwort genannt, da diese durch die Sekretion der α -Amylase ausgelöst werden konnte (Hyyryläinen et al., 2001, Darmon et al., 2002, Westers et al., 2006). Für die Nutzung dieses Systems als Biosensor wird ein Fluoreszenzreportergen genomisch unter Kontrolle des P_{*htrA*} Promotors integriert, wodurch der Sekretionsstress über die messbare Fluoreszenz des Reporters quantifizierbar ist. Sekretionsstress-Biosensoren konnten bereits für *B. subtilis* und *C. glutamicum* konstruiert werden (Trip et al., 2011, Jurischka et al., 2020).

3.2.1 Etablierung eines Sekretionsstress-Biosensors in *B. subtilis* DB430

3.2.1.1 Mit dem *sfGFP*-basierten Sekretionsstress-Biosensorstamm *B. subtilis* PAL4 kann der zelluläre Sekretionsstress bei der Sekretion von verschiedenen Proteinen ausgelesen werden

Als erster Schritt zum kombinatorischen Nachweissystem für sekretierte Proteine (Kapitel 3.2) wurde ein Sekretionsstress-Biosensor in *B. subtilis* DB430 etabliert. Bei der Konstruktion von diesem diente der seit einiger Zeit erfolgreich genutzte Sekretionsstress-Biosensorstamm *C. glutamicum* K9 als Modell (Jurischka et al., 2020, Bakkes et al., 2021). Dieser Stamm wurde konstruiert, indem *htrA* genomisch durch *eYFP* als Fluoreszenzreportergen ersetzt wurde. Aufgrund seiner hohen Quantenausbeute und der bisherigen Experimente mit Sekretionsstress-Biosensoren wurde *sfGFP* als Fluoreszenzreporter ausgewählt und der putative *sfGFP*-basierte Sekretionsstress-Biosensor *B. subtilis* PAL4 konstruiert (Kapitel 2.5.15.1). Um zu prüfen, ob dieselbe genomische Konstruktion wie in *C. glutamicum* auch in *B. subtilis* zu einem verwendbaren Sekretionsstress-Biosensor führt, wurden zusätzlich mit *B. subtilis* PAL2 und *B. subtilis* PAL3 ein *sfGFP*-Positiv- und ein *sfGFP*-Negativkontrollstamm

konstruiert (Kapitel 2.5.15.1). Bei dem *sfGFP*-Positivkontrollstamm *B. subtilis* PAL2 wurde *sfGFP* unter Kontrolle des starken konstitutiven P_{HpaII} Promotors in den *htrA* Locus integriert und bei dem *sfGFP*-Negativkontrollstamm *B. subtilis* PAL3 wurde der P_{htrA} Promotor entfernt und damit *sfGFP* promotorlos in den *htrA* Locus integriert (Kapitel 2.5.15.1; Abb. 2.2). In einer früheren Studie zu Sekretionsstress-Biosensoren konnte das natürliche Sekretom von *B. subtilis* über eine messbare Reporter-Fluoreszenz ausgelesen werden (Trip et al., 2011). Daher wurde auch in dieser Arbeit die Funktion des putativen Biosensorstammes *B. subtilis* PAL4 zunächst anhand des natürlichen Sekretoms geprüft. Dafür wurden *B. subtilis* PAL2 bis PAL4 für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.4.4.3) und die *sfGFP*-Fluoreszenz spektrometrisch ausgelesen (Kapitel 2.7.4; Abb. 3.11A).

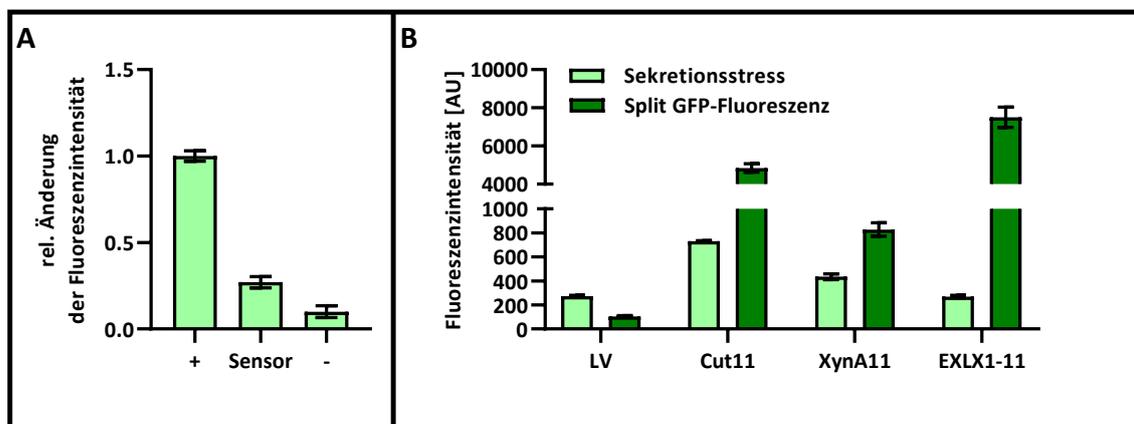


Abb. 3.11: Evaluierung des *sfGFP*-basierten Sekretionsstress-Biosensors *B. subtilis* PAL4. **A** Untersucht wurden der putative *sfGFP*-basierte Sekretionsstress-Biosensorstamm *B. subtilis* PAL4 mit *sfGFP* unter Kontrolle des P_{htrA} Promotors (Sensor), die Positivkontrolle *B. subtilis* PAL2 mit *sfGFP* unter Kontrolle des starken konstitutiven P_{HpaII} Promotors (+) und *B. subtilis* PAL3 mit promotorlosem *sfGFP* (-). Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf die Intensität der Positivkontrolle normiert. Die Stämme wurden für 24 Stunden in oLB in FlowerPlates® bei 30°C und 1100 UpM kultiviert. **B** Es wurden Transformanten hinsichtlich der sekretierten Proteinmenge mittels Split GFP Assays (dunkelgrün) und der dabei entstandenen zellulären Stressantwort (hellgrün) untersucht. Dafür wurde *B. subtilis* PAL4 mit pBS-4nt-SP_{pel}-Cut11 (Cut11), pBSMu11-wtXynA-GFP11 (XynA11), pBSMu11-wtEXLX1-GFP11 (EXLX1-11) oder dem pBSMu11 Leervektor (LV) transformiert. Diese Plasmide tragen die Gene der Cutinase (Cut), Xylanase A (XynA) oder des Swollenins EXLX1 (EXLX1). Die Sekretion wird bei Cut über das Signalpeptid der Pectatlyase Pel (SP_{pel}) vermittelt. Die Sekretion von XynA und EXLX1 werden mit den nativen Signalpeptiden vermittelt. Bei allen Genen wurde an das 3'-Ende die Sequenz des GFP11-tags fusioniert. Die Transformanten wurden für 24 Stunden bei 30°C in 1 ml oLB-Medium bei 1100 UpM kultiviert. Alle Messungen wurden in biologischen und technischen Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mittelwerte mit den Standardabweichungen der biologischen Replikate als Fehlerbalken.

B. subtilis PAL2 wies die höchste Fluoreszenz auf, was zu erwarten war, da *sfGFP* konstitutiv exprimiert wurde. Die Fluoreszenz der Negativkontrolle, *B. subtilis* PAL3, erreichte mit $10,0 \pm 3,3$ % der Positivkontrolle das schwächste Signal. Da die mit *B. subtilis* PAL4 gemessene Fluoreszenz mit etwa 25 % der Fluoreszenz der Positivkontrolle zwischen beiden Kontrollstämmen lag, konnte davon ausgegangen werden, dass im *B. subtilis* PAL4-Stamm, der

htrA-Promotor unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen durch die Sekretion des natürlichen Sekretoms induziert wurde. Der so konstruierte Sekretionsstress-Biosensor scheint somit grundsätzlich funktionell zu sein.

Um diese Vermutung weiter zu bestätigen, wurde als nächstes die rekombinante Sekretion der Cutinase (Cut) aus *Fusarium solani pisi* (Martinez et al., 1992) und zweier homologer Proteine analysiert. Cut ist ein oft genutztes Modellprotein für die rekombinante Proteinsekretion und wurde auch bei der Etablierung des *C. glutamicum* K9 Biosensorstammes verwendet (Jurischka et al., 2020). Bei den beiden homologen Proteinen handelte es sich zum einen um die Xylanase A (XynA), die am Xylanabbau beteiligt ist (Lindner et al., 1994), und um das zu den Expansinen gehörende Swollenin (EXLX1), welches eine unterstützende Funktion beim Zelluloseabbau hat (Baichoo et al., 2002, Kim et al., 2013). Ausgewählt wurden diese drei Proteine, da diese in dieser Arbeitsgruppe bereits erfolgreich in *B. subtilis* sekretiert und über den Split GFP Assay nachgewiesen werden konnten (Knapp et al., 2017, Volkenborn unveröffentlicht). Sie boten daher optimale Voraussetzungen für die Evaluierung des hier konstruierten Biosensors. Für die Analyse wurde *B. subtilis* PAL4 mit einem der Plasmide pBS-4nt-SP_{Pel}-Cut11, pBSMul1-wtXynA-GFP11 oder pBSMul1-wtEXLX1-GFP11 bzw. dem pBSMul1 Leervektor (Tab. 2.2) transformiert (Kapitel 2.4.5). Für die Durchführung des Split GFP Assays waren die Zielproteine Cut, XynA und EXLX1 C-terminal mit dem GFP11-*tag* fusioniert (Cut11, XynA11, EXLX1-11). Die Sekretion wurde im Falle der Cut11 durch das Signalpeptid der Pectatlyase Pel, mit dem gute Ausbeuten erreicht werden konnten (Brockmeier et al., 2006a), vermittelt (Nasser et al., 1993). Die homologen Proteine XynA11 und EXLX1-11 besaßen das native Signalpeptid. Die Transformanten wurden für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Danach wurde der Sekretionsstress anhand des Sensorsignals (Kapitel 2.7.4) und die Zielproteine über den *in vitro* Split GFP Assay (Kapitel 2.7.3.1) detektiert (Abb. 3.11B).

Zunächst konnte durch die vom Leervektorhintergrund unterscheidbaren holo-GFP-Fluoreszenzintensitäten im zellfreien Überstand bei der Nutzung des Split GFP Assays bestätigt werden, dass alle drei Zielproteine sekretiert wurden. Ein direkter Vergleich der sekretierten Mengen bei verschiedenen Zielproteinen durch den Split GFP Assay war durch potenziell unterschiedliche Zugänglichkeiten des GFP11-*tags* für den Detektor nicht möglich, aber für die rein funktionelle Überprüfung des Biosensor auch nicht nötig. Wie bereits in Abb. 3.11A konnte der basale Sekretionsstress anhand der Zellen, die den Leervektor trugen, ausgelesen werden. Das Stresslevel der EXLX1-11 sekretierenden Zellen lag auf dem gleichen Niveau wie das basale Stresslevel (LV: 268,31 ± 11,91 AU; EXLX1-11: 274,50 ± 5,67 AU). Die Sekretion des homologen

Proteins XynA11 zeigte eine erhöhte Stressantwort. Im Vergleich zur heterologen Cut11, deren auslesbare *sfGFP*-Fluoreszenz $730,58 \pm 4,35$ AU betrug, war diese jedoch deutlich geringer (Sekretionsstress Cut11 > XynA11 > EXLX1-11). Somit konnte durch zielproteinabhängige Unterschiede in den Sekretionsstress-Sensorsignalen die bereits durch Abb. 3.11A vermutete Funktionalität des Biosensorstammes *B. subtilis* PAL4 bestätigt werden. Wie bei den Split GFP Assay Daten lassen sich mit variierenden Stresssensor-Signalen bei unterschiedlichen Zielproteinen keine Auskünfte über die tatsächlich in den Überstand sekretierte Menge des jeweiligen Zielproteins geben (Westers et al., 2006). Die verschiedenen Zielproteine könnten unterschiedlich hohe Effizienzen haben von dem extrazellulären Chaperon PrsA korrekt gefaltet zu werden (Quesada-Ganuza et al., 2019). Denkbar wäre aber ebenso, dass die verschiedenen Zielproteine auch unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten haben von einer der extrazellulären Proteasen von *B. subtilis* degradiert zu werden (Westers et al., 2006). Dadurch entsteht eine Diskrepanz zwischen tatsächlich sekretierter und im Überstand nachweisbarer Proteinmenge, welche durch die Kombination des Sekretionsstress-Biosensors und einer Methode zur Quantifizierung von Proteinen analysiert werden könnte.

3.2.1.2 Mit dem mCherry-basierten Sekretionsstress-Biosensorstamm *B. subtilis* PAL5 kann die durch die Cut11-Sekretion verursachte zelluläre Stressantwort *online* ausgelesen werden

Nach der erfolgreichen Klonierung des *sfGFP*-basierten Sensorstammes *B. subtilis* PAL4, war das nächste Ziel die Konstruktion eines mCherry-basierten Sekretionsstress-Biosensors. Dies war notwendig, um das Signal des Stress-Biosensors von dem des Split GFP Signals in *in vivo* Messungen unterscheiden zu können. Zwar hat *sfGFP* den Vorteil der höheren Quantenausbeute und Fluoreszenzhelligkeit gegenüber mCherry (Shaner et al., 2004, Pédelaq et al., 2005), jedoch kann nur Letzteres in Kombination mit dem Split GFP Assay genutzt werden. Aus diesem Grund wurde der mCherry-basierte Sekretionsstress-Biosensor *B. subtilis* PAL5 mit CRISPR/Cas9 hergestellt (Kapitel 2.5.15.2).

Für weitere Untersuchungen bezüglich des Sekretionsstress wurde nach der Betrachtung verschiedener Zielproteine in Kapitel 3.2.1.1 die, durch verschiedene Signalpeptide vermittelte, Cut11-Sekretion analysiert. Zusätzlich wurde überprüft, ob der Sekretionsstress bereits während der Kultivierung in einem BioLector® Mikrobioreaktor ausgelesen werden kann, wie es bei dem eYFP-basierten Stamm *C. glutamicum* K9 der Fall ist (Jurischka et al., 2020, Bakkes et al., 2021). Vorangegangene Studien identifizierten die Signalpeptide der extrazellulären Protease Epr (SP_{Epr} ; Sloma et al., 1988), der extrazellulären Ribonuklease Bsn (SP_{Bsn} ; Nakamura

et al., 1992) und der Pectatlyase Pel (SP_{Pel} ; Pickersgill et al., 1994) aus *B. subtilis*, als gut geeignet für die Cut11-Sekretion. Die Sekretion von Cut11 kann durch Fusion mit diesen drei Signalpeptiden graduell moduliert werden ($SP_{Pel} > SP_{Bsn} > SP_{Epr}$; Volkenborn et al., 2020), weshalb hier zur weiteren Evaluierung des mCherry-basierten Sekretionsstress-Biosensors auf dieses Set zurückgegriffen wurde. Für die Analyse wurde *B. subtilis* PAL5 mit den Plasmiden pBS-4nt- SP_{Epr} -Cut11, pBS-4nt- SP_{Bsn} -Cut11, pBS-4nt- SP_{Pel} -Cut11 oder dem pBSMul1 Leervektor transformiert (Kapitel 2.4.5). Für das Auslesen des Sekretionsstress während der Kultivierung wurden die Transformanten in einem BioLector® Mikrobioreaktorsystem für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.4.4.3; Abb. 3.12A). Zusätzlich wurde die sekretierte Cut11 nach der Kultivierung durch die Messung der hydrolytischen Aktivität mit dem kolorimetrischen Substrat pNPP bestimmt (Kapitel 2.6.4; Abb. 3.12B).

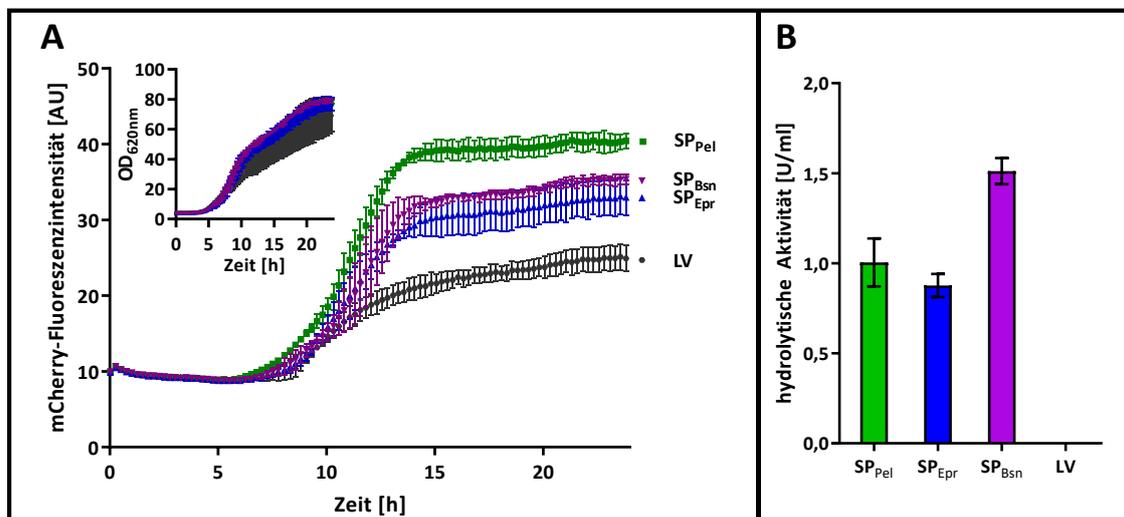


Abb. 3.12: Analyse der Cutinasesekretion mit verschiedenen Signalpeptiden. **A** Wachstum (Lichtstreuung bei $\lambda = 620$ nm) und Sekretionsstress, angezeigt durch mCherry-Fluoreszenzintensität, wurden *online* in einem BioLector® Mikrobioreaktorsystem gemessen. Dafür wurden *B. subtilis* PAL5-Transformanten, welche eines der Plasmide pBS-4nt-SPPel-Cut11 (SP_{Pel}), pBS-4nt-SPEpr-Cut11 (SP_{Epr}), pBS-4nt-SPBsn-Cut11 (SP_{Bsn}) oder den Leervektor pBSMul1 (LV) trugen, für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM kultiviert. Alle Plasmide verfügen über einen 4 nt langen RBS-Spacer zwischen SD-Sequenz und *cut11* Startcodon und zusätzlich über die Sequenz des GFP11-tags am 3'-Ende der *cut*. **B** Auf eine OD_{580nm} von 1 normierte hydrolytische Aktivitäten des zellfreien Kulturüberstandes mit pNPP der im BioLector® kultivierten und überwachten Kulturen. Die Ergebnisse repräsentieren biologische Triplikate. Bei den Aktivitätsmessungen wurden zusätzlich technische Triplikate genutzt. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mittelwerte mit den Standardabweichungen der biologischen Replikate als Fehlerbalken.

Alle Cut11-produzierenden Kulturen zeigten ein ähnliches Wuchsverhalten (Abb. 3.12A, Einschub). Entsprechend konnten die gemessenen mCherry-Fluoreszenzintensitäten des Biosensors mit den verschiedenen *cut11*-exprimierenden Stämmen direkt miteinander verglichen werden. Alle gemessenen Stämme zeigten eine Zunahme der mCherry-Fluoreszenz ab der exponentiellen Wachstumsphase (etwa sechs Stunden nach der Inokulation) bis etwa zwölf Stunden nach Kultivierungsbeginn. *B. subtilis* PAL5 zeigte ein relativ hohes basales Stresslevel

($25,11 \pm 1,63$ AU bei der Leervektor-Kontrolle) wie es auch bereits für *B. subtilis* PAL4 gezeigt werden konnte (Abb. 3.11A). Die mCherry-Fluoreszenz für die Varianten SP_{Epr} und SP_{Bsn} waren während der gesamten Kultivierung ähnlich und erreichten am Ende der Kultivierung eine Fluoreszenz von $33,12 \pm 2,31$ AU bzw. $35,47 \pm 0,48$ AU. Bei der SP_{Pel}-Variante stieg die mCherry-Fluoreszenz früher und auch stärker an, was in einer etwa 1/3 höheren mCherry-Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den beiden anderen Varianten am Ende resultierte. Die SP_{Epr}-Variante, welche bereits das geringste messbare Stresssensormesssignal hatte, wies auch mit $0,88 \pm 0,06$ U/ml die geringste enzymatische Aktivität auf. Im Gegensatz dazu zeigte SP_{Bsn} mit einer ähnlichen Stressantwort wie SP_{Epr} eine um etwa 50 % erhöhte Aktivität im Vergleich zu SP_{Epr} ($1,51 \pm 0,07$ U/ml). Die SP_{Pel}-Variante, welche den höchsten Stresslevel aufwies, zeigte nur eine minimal erhöhte Aktivität im Vergleich zu SP_{Epr} ($1,00 \pm 0,13$ U/ml). Die Tatsache, dass SP_{Bsn} vermittelt deutlich mehr Cut11 sekretiert wurde als SP_{Pel}-vermittelt, widerspricht den Ergebnissen einer früheren Studie (Volkenborn et al., 2020). Dies könnte durch die Nutzung eines anderen Mediums und den veränderten Kultivierungsbedingungen zustande gekommen sein. Das in dieser Arbeit verwendete oLB-Medium verfügt über die vierfache Tryptonmenge (Kapitel 2.4.1), wodurch die Kulturen in einer 24-stündigen Kultivierung etwa die doppelte Biomasse erreichen als bei der Verwendung von LB-Medium (Abb. 7.3 im Anhang). Bei der Cutinasesekretion in *C. glutamicum* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei der Kultivierungsoptimierung die durch verschiedene Signalpeptide vermittelte Cutinasesekretion signalpeptidabhängig unterschiedlich stark verbessert wurde, wodurch sich auch die Reihenfolge unter den Signalpeptiden veränderte (Hemmerich et al., 2019).

Bei der Variation von Signalpeptiden in Fusion mit dem gleichen Zielprotein konnte keine Korrelation zwischen aktiver Cut11 im Überstand und Sekretionsstress nachgewiesen werden. Die Gründe für diese Diskrepanz sind vielfältig. So ist SP_{Pel} ein deutlich kürzeres und weniger hydrophobes Signalpeptid als SP_{Bsn} und SP_{Epr} (Abb. 7.4 im Anhang). Beim Vergleich einer ähnlichen Signalpeptidkonstellation zwischen den Signalpeptiden der α -Amylase, der Levansucrase und der Levanase aus *B. subtilis* konnte nachgewiesen werden, dass das hinsichtlich der Länge und Hydrophobizität zu SP_{Pel} ähnliche Signalpeptid der Levansucrase deutlich langsamer von einer SPase I abgespalten wurde (Leloup et al., 1999) und dadurch die Faltung beeinflusst werden könnte. Durch den Austausch des Signalpeptides werden aber noch weitere Effekte beeinflusst. So zeigen die drei hier genutzten Expressionskonstrukte stark unterschiedliche TIR (Volkenborn et al., 2020). Die um den Faktor zehn höhere TIR für SP_{Pel} könnte, wie es bei Überexpressionen beobachtet wurde, zur Überladung des Chaperons PrsA führen (Sarvas et al., 2004), was wiederum in erhöhter Fehlfaltungsrate resultieren könnte. Für

eine abschließende Erklärung fehlt gegenwärtig noch das nötige Grundlagenwissen zum Zusammenspiel von Signalpeptiden mit der Proteinbiosynthese und der Sekretion, was aber auch nicht Fokus dieser Arbeit war. Abschließend konnte gezeigt werden, dass mit dem mCherry-basierten Biosensorstamm *B. subtilis* PAL5 die Quantifizierung des Sekretionsstressess möglich war und dieser zusätzlich sogar während der Kultivierung in einem BioLector® Mikrobioreaktor ausgelesen werden kann.

Zusammenfassend konnten in Kapitel 3.2.1 mit den Stämmen *B. subtilis* PAL4 und *B. subtilis* PAL5 zwei Sekretionsstress-Biosensorstämme etabliert und evaluiert werden, welche die zelluläre Stressantwort auf die (rekombinante) Proteinsekretion durch die Produktion von sfGFP bzw. mCherry auslesbar machten. Anhand des mCherry-basierten Stammes *B. subtilis* PAL5 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Stressantwort bereits während der Kultivierung in einem BioLector® Mikrobioreaktor ausgelesen werden konnte (Abb. 3.12). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der messbare Sekretionsstress bei verschiedenen Signalpeptiden für das gleiche Zielprotein (hier Cut11) nicht mit der Menge an aktivem Zielprotein im Überstand korreliert (Abb. 3.12). Dies widerspricht der in der Literatur explizit beschriebenen Verwendung des Sekretionsstress-Biosensors für das Screenen von großen Signalpeptid-Banken, was ebenfalls am Beispiel von drei unterschiedlichen Signalpeptiden für die Sekretion der Cutinase in *C. glutamicum* postuliert wurde (Jurischka et al., 2020). Um eindeutige Aussagen über die Nutzbarkeit für Signalpeptid-Screenings zu machen, müsste dementsprechend eine weitaus größere Anzahl an unterschiedlichen Signalpeptiden untersucht werden. Dennoch ist der Sekretionsstress, der für akkumuliertes, fehlgefaltetes Protein an der Zellmembran steht (Westers et al., 2006, Trip et al., 2011, Jurischka et al., 2020), eine nicht zu vernachlässigende zelluläre Information von biotechnologischer Relevanz, welche mit den hier konstruierten Sensoren ohne großen Mehraufwand ausgelesen werden kann. Akkumulation von fehlgefaltetem Protein kann die Membranintegrität stören, was zu Wachstumsdefekten und im schlimmsten Fall zu Zellyse führen kann (Noone et al., 2001, Hyryläinen et al., 2001, Pohl et al., 2013). Somit wäre die Kombination des Sekretionsstress-Biosensors mit einer Nachweismethode wie dem Split GFP Assay eine logische Schlussfolgerung. Mit diesem kombinierten System ließe sich das sekretierte Zielprotein und die Sekretions- bzw. Faltungseffizienz auslesen. Dies könnte die Auswahl bei Optimierungsstrategien wie etwa Signalpeptid-Screenings, bei denen meist mehrere Varianten eine ähnliche Zielproteinmenge sekretieren (Brockmeier et al., 2006a, Degering et al., 2010), vereinfachen.

3.2.2 Entwicklung eines minimal invasiven *in vivo* Split GFP Assay Ansatzes

3.2.2.1 Der Split GFP Assay kann als minimal invasive *in vivo* Nachweismethode genutzt werden

Nachdem mit dem Sekretionsstress-Biosensorstamm *B. subtilis* PAL5 die erste Komponente des Systems zur Sekretionsanalyse (Abb. 3.10) entwickelt werden konnte (Kapitel 3.2.1), war das nächste Ziel die Etablierung einer *in vivo* Proteinquantifizierungsmethode auf Basis des Split GFP Assays (Knapp et al., 2017). Für die *in vitro* Anwendung werden nach der Kultivierung Zellen und Kulturüberstand mittels Zentrifugation voneinander getrennt, bevor das extern in *E. coli* BL21(DE3) produzierte GFP1-10 zum Überstand gegeben wird. Damit der Detektor und der GFP11-*tag* des Zielproteins zu einem fluoreszierenden holo-GFP rekonstituieren können, muss die Lösung anschließend für mindestens 16 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert werden (Knapp et al., 2017). Für eine ähnliche einfache Anwendbarkeit des Split GFP Assays bei einer *in vivo* Detektion wurden Bedingungen gesucht, bei denen der extern produzierte Detektor direkt in das Kulturmedium gegeben werden und die während der Kultivierung in einem BioLector® Mikrobioreaktor entstehende Split GFP-Fluoreszenz ausgelesen werden konnte. Damit der *in vivo* Split GFP Assay als eine möglichst sensitive Methode etabliert werden konnte, wurde als Zielprotein hier die Cut11-Variante SP_{Epr} ausgewählt, die in Kapitel 3.2.1.2 die geringste Cut11-Sekretion zeigte. *B. subtilis* PAL5 wurde mit dem Plasmid pBS-4nt-SP_{Epr}-Cut11 transformiert, bevor dieser Stamm unter Standardbedingungen im BioLector® Mikrobioreaktor für 24 Stunden kultiviert wurde (Kapitel 2.4.4.3). Während der Kultivierung wurden alle 15 Minuten die Biomasse und die GFP-Fluoreszenz ausgelesen. Zur Überprüfung des optimalen Zugabezeitpunktes wurden je 3 % (v/v) 1x Detektor (Kapitel 2.6.6) zu sechs verschiedenen Zeitpunkten in das Kulturmedium gegeben (Abb. 3.13).

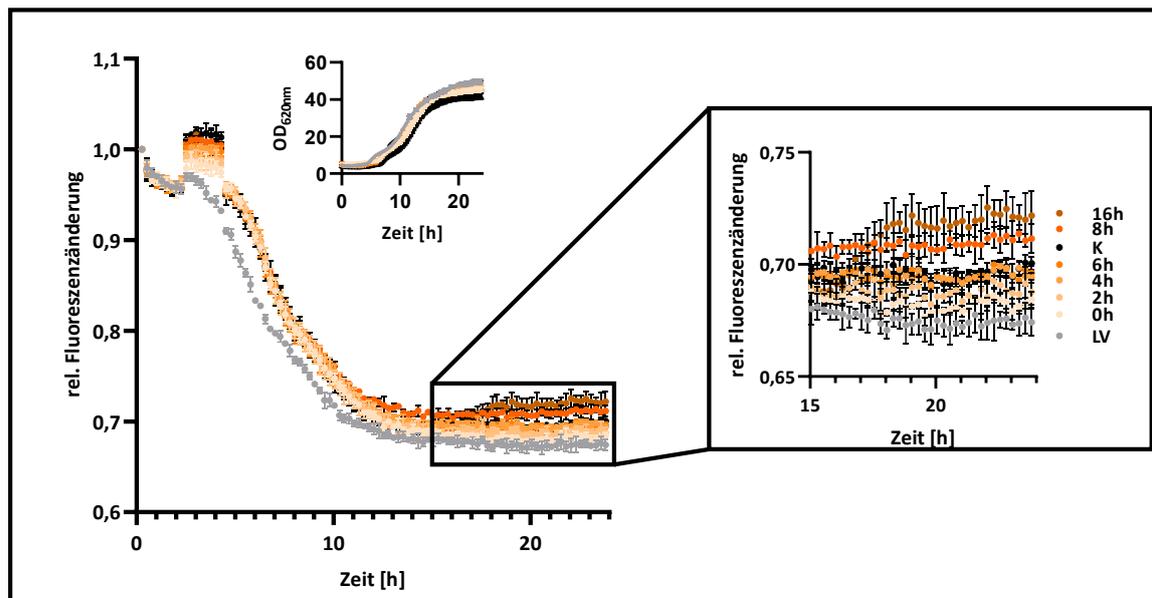


Abb. 3.13: Etablierung eines nicht invasiven *in vivo* Split GFP Assays. Zur Etablierung wurde *B. subtilis* PAL5 mit dem Plasmid pBS-4nt-SP_{Epr}-Cut11 transformiert. Das Plasmid trägt einen 4 nt langen RBS-Spacer zwischen SD-Sequenz und Startcodon der SP_{Epr}-cut. Zusätzlich wurde der cut am 3'-Ende die Sequenz des GFP11-tags fusioniert. Die Transformanden wurden in einem BioLector® Mikrobioreaktorsystem für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM in einer FlowerPlate kultiviert. Die Biomasse (Lichtstreuung bei $\lambda = 620$ nm) und die GFP-Fluoreszenz wurden während der Kultivierung alle 15 Minuten ausgelesen. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf den Startwert normiert. Das GFP1-10 Detektorprotein wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung dem Medium zugegeben. Als Negativkontrolle diente eine Variante ohne Detektor (K). Für eine bessere Visualisierung wurden die Messdaten der Stunden 15 bis 24 vergrößert dargestellt. Die Kultivierungen wurden in biologischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Da alle beobachteten Stämme ein ähnliches Wachstum aufwiesen, konnten die Fluoreszenzintensitäten direkt miteinander verglichen werden (Abb. 3.13, Einschub). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Intensitäten auf den Zeitpunkt $t=0$ normiert. Innerhalb der ersten zehn Kultivierungsstunden nahm die Fluoreszenz der Kultur kontinuierlich ab, bis sie sich bei 0,7 stabilisierte. Diese Abnahme ist durch die Degradation der fluoreszierenden Bestandteile des oLB-Mediums bedingt. Messbare Split GFP-Fluoreszenzen konnten nur bei der Zugabe des Detektors nach acht und 16 Stunden erreicht werden, wobei die Proben mit Zugabe nach 16-stündiger Kultivierung höhere Intensitäten aufwiesen. Bei allen anderen Zugabezeitpunkten konnte keine von der Negativkontrolle unterscheidbare Fluoreszenz detektiert werden, obwohl alle Kulturen am Ende der Kultivierung eine ähnliche Cut11-Aktivität aufwiesen (Kapitel 2.6.4; Abb. 7.5A im Anhang). Somit konnte geschlossen werden, dass die Cut11-Sekretion *in vivo* erst bei Detektorzugabe nach achtstündiger Kultivierung durch den Split GFP Assay auslesbar war und durch eine Zugabe nach 16-stündiger Kultivierung verbessert werden konnte. Als mögliche Erklärung kam eine Degradierung von GFP1-10 durch mindestens eine der sechs noch in *B. subtilis* PAL5 vorkommenden extrazellulären Proteasen vor der

Rekonstitution mit dem GFP11-*tag* in Frage. Da die *cut11* Expression unter Kontrolle des starken konstitutiven P_{HpalI} Promotors vorwiegend in der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte (Beginn $t=8$; Guan et al., 2016), wäre die Rekonstitution zu holo-GFP erst ab diesem Zeitpunkt möglich und Detektorproteine zunehmend gegen Degradierung geschützt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde sowohl aus Einschlusskörperchen gereinigtes GFP1-10 (Kapitel 2.6.6) als auch *sfGFP* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Vera Svensson) auf eine Gesamtproteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt (Kapitel 2.6.2) und mit *B. subtilis* Überständen versetzt, bevor in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und für eine Analyse mittels SDS-PAGE vorbereitet wurden (Kapitel 2.6.3; Abb. 3.14A). Wie die entwickelte Hypothese erwarten ließ, wurde GFP1-10 im Überstand von *B. subtilis* innerhalb kürzester Zeit degradiert. So konnte der Detektor bereits nach nur einer Stunde nur noch minimal auf dem gefärbten SDS-Gel (Kapitel 2.6.3) detektiert werden. Im Vergleich dazu war die *sfGFP*-Menge über die gesamte Dauer der Inkubation konstant. Die unterschiedliche Bandenintensität zu Inkubationsbeginn wird darauf zurückzuführen sein, dass das aus Einschlusskörperchen gereinigte GFP1-10 nicht über die gleiche Reinheit verfügte wie *sfGFP* und bei gleicher Gesamtproteinmenge weniger GFP1-10 eingesetzt wurde. Die Proteasen zur Aufnahme von Nährstoffen werden in *B. subtilis* erst mit Beginn der stationären Phase über das Zweikomponentensystem DegU/DegS hochreguliert und vermehrt sekretiert (Mäder et al., 2003, Msadek et al., 1995). GFP1-10 wird jedoch schon deutlich vor der stationären Wachstumsphase degradiert, sodass DegU/DegS-unabhängige Proteasen verantwortlich sein mussten. Die dafür in Frage kommenden Proteasen wären die Proteasen des CsaRS Zweikomponentensystems HtrA und HtrB oder die zellmembranassoziierte Protease WprA (Darmon et al., 2002, Stephenson et al., 1998, Harwood et al., 2008). Durch die Detektorzugabe während der Kultivierung der SP_{Epr} Varianten konnte keine messbare Stressantwort in *B. subtilis* PAL5 gemessen werden (Abb. 7.6 im Anhang), was die Vermutung nahe legte, dass WprA, als in der exponentiellen Wachstumsphase konstitutiv produzierte Protease (Margot et al., 1996), GFP1-10 degradiert und nicht HtrA oder HtrB. Bestärkt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass *wprA*-defiziente Stämme eine erhöhte Ausbeute an heterolog sekretierten Proteinen aufweisen (Lee et al., 2000, Pohl et al., 2013). Zur Kontrolle dieser Hypothese wurde der *wprA*-defiziente Stamm *B. subtilis* WB800N (Tab. 2.1) unter Standardbedingungen für 24 Stunden kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Analog zur Detektorzugabe (Abb. 3.13) wurde auch in diesem Fall zu verschiedenen Zeitpunkten 3 % (v/v) 1x GFP1-10 (Kapitel 2.6.6) zugegeben. Am Ende der Kultivierung wurden Proben für die Analyse der Detektorproteolyse durch eine SDS-PAGE entnommen (Kapitel 2.6.3; Abb. 3.14B).

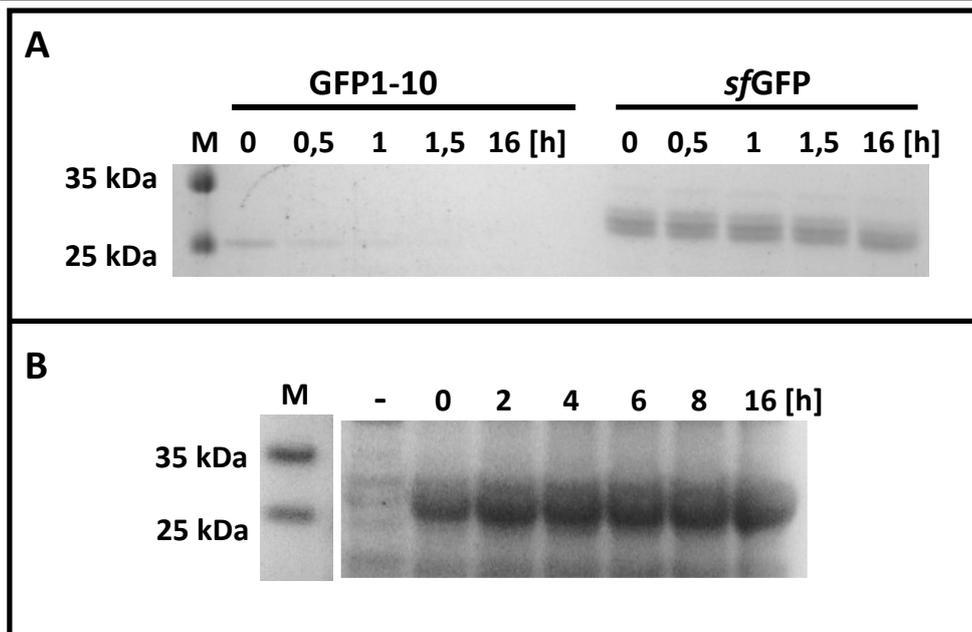


Abb. 3.14: Analyse der GFP1-10 Proteolyse in *B. subtilis*. **A** SDS-PAGE (4-12 % Bis-Tris) mit anschließender Coomassie-Färbung. Zur Analyse der GFP1-10 Degradation durch eine extrazelluläre Protease im *B. subtilis* Überstand wurde jeweils 1 mg/ml Gesamtproteinkonzentration des aus Einschlusskörperchen gereinigten GFP1-10 bzw. sfGFP mit stationärem *B. subtilis* Überstand versetzt und bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Vor der Inkubation und in regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen. **B** SDS-PAGE (4-12 % Bis-Tris) mit anschließender Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind Überstände des *wprA*-defizienten *B. subtilis* WB800N, wobei jeder Kultur zu einem der Zeitpunkte 0, 2, 4, 6, 8 oder 16 Stunden nach der Inokulation je 3 % (v/v) 1x GFP1-10 zugeführt wurde. Als Negativkontrolle fungierte eine Kultur, der kein GFP1-10 zugeführt wurde (-). Die Überstände wurden durch Präzipitation entsprechend einer $OD_{580nm} = 50$ ausgehend von der Trübung der Kultur eingestellt. Zum Größenvergleich der Proben wurde der Molekulargewichtsstandard „Prestained Protein Ladder™“ (M) verwendet.

Auf dem anschließend mit Coomassie gefärbten SDS-Gel konnte durch die gleichbleibende Bandenintensität des GFP1-10 gezeigt werden, dass *B. subtilis* WB800N den Detektor nicht degradieren konnte. Da *B. subtilis* WB800N bereits genomisch integrierte Resistenzen gegen Bleomycin, Hygromycin und Kanamycin hat (Jeong et al., 2018), war die Nutzung dieses Stammes für diese Arbeit nicht möglich. Die Regulation der Qualitätskontrollprotease WprA gehört zum Regulationsnetzwerk des Katabolitkontrollproteins CcpA (Henkin et al., 1991), welches als Transkriptionsfaktor die Expression von 264 Genen in *B. subtilis* reguliert (Pedreira et al., 2021). Dabei ist die Hauptfunktion in Anwesenheit von Intermediaten des Glukosestoffwechsels die Expression von Genen wie *wprA* zu reprimieren (Marciniak et al., 2012, Stülke et al., 1999, Hueck et al., 1995).

Um zu überprüfen, ob das Signal des *in vivo* Split GFP Assays durch die Repression der *wprA* Expression verstärkt werden kann, wurden erneut mit pBS-4nt-SP_{Epr}-Cut11 transformierte *B. subtilis* PAL5 (Kapitel 2.4.5) für 24 Stunden unter Standardbedingungen in FlowerPlates® kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Für die Repression wurde das Kulturmedium zu Beginn der Kultivierung mit 1 % (w/v) Glukose versetzt. Zusätzlich wurde zu den gleichen

Zugabezeitpunkten wie zuvor (Abb. 3.13) 3 % (v/v) 1x Detektor (Kapitel 2.6.6) zugegeben. Die Kultivierung wurde im BioLector® Mikrobioreaktor alle 15 Minuten hinsichtlich der Biomasse-, mCherry-Fluoreszenz- und GFP-Fluoreszenzentwicklung überprüft (Abb. 3.15).

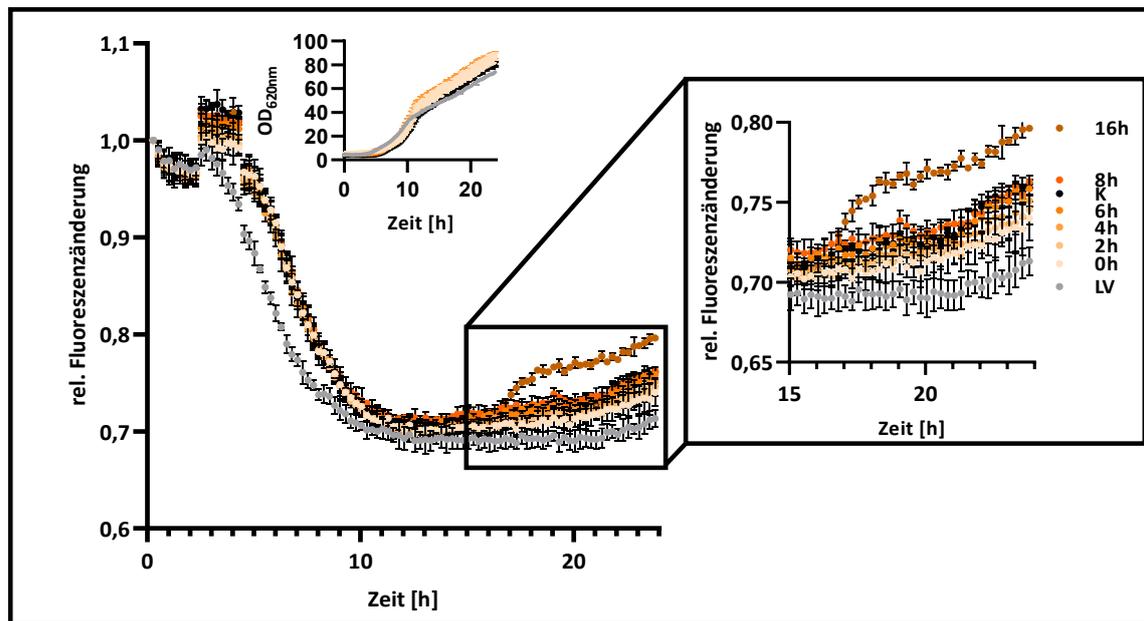


Abb. 3.15: Etablierung eines nicht invasiven *in vivo* Split GFP-Ansatzes bei gleichzeitiger Repression der *wprA* Expression. *B. subtilis* PAL5 wurde mit dem Plasmid pBS-4nt-SP_{Epr}-Cut11 transformiert. Das Plasmid trägt einen 4 nt langen RBS-Spacer zwischen SD-Sequenz und Startcodon der SP_{Epr}-cut. Zusätzlich wurde die Sequenz des GFP11-tags am 3'-Ende der cut angefügt. Die Transformanten wurden in einem BioLector® Mikrobioreaktorsystem für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM in einer FlowerPlate kultiviert. Die Biomasse (Lichtstreuung bei $\lambda = 620$ nm) und die GFP-Fluoreszenz wurden während der Kultivierung alle 15 Minuten ausgelesen. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf den Startwert normiert. Zu Beginn der Kultivierung wurde zur Repression der Expression des *wprA* 1 % (w/v) Glukose zugegeben. Je 3 % (v/v) GFP1-10 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung den Kulturen zugegeben. Als Negativkontrolle wurde einer Kultur kein GFP1-10 zugeführt (K). Für eine bessere Visualisierung wurden die Messdaten der Stunden 15 bis 24 vergrößert dargestellt. Die Kultivierungen wurden in biologischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Die Fluoreszenzintensitäten wurden für eine bessere Vergleichbarkeit auf die Fluoreszenz zu Kultivierungsbeginn ($t=0$) normiert. Wieder zeigte sich innerhalb der ersten zehn Stunden der Kultivierung bedingt durch die Degradation der fluoreszierenden Komponenten des Vollmediums eine stark abfallende Fluoreszenz. Mit der Glukosezugabe konnte 16 Stunden nach der Inokulation ein von der Negativkontrolle aufgetrenntes Fluoreszenzsignal detektiert werden ($0,79 \pm 0,01$ zu $0,76 \pm 0,01$). Erneut war die sekretierte Cut11-Menge, bestimmt über die hydrolytische Aktivität mit pNPP (Kapitel 2.6.4), ähnlich (Abb. 7.5B). Somit wurde in diesem Kapitel eine minimal invasive *in vivo* Anwendung des Split GFP Assays etabliert. Bei dieser Anwendung wird das Kulturmedium zur Repression der Expression von *wprA* zu Beginn der Kultivierung mit Glukose und nach 16-stündiger Kultivierung zur Detektion mit GFP1-10 versetzt.

3.2.2.2 Mit dem *in vivo* Split GFP Assay kann die Cut11-Sekretion ausgelesen werden

In Kapitel 3.2.2.1 konnte durch die Verwendung nur einer Signalpeptidvariante die Cut11-Sekretion mit dem *in vivo* Split GFP Assay qualitativ nachgewiesen werden. Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob auch vergleichende Zielproteinbestimmungen mit diesem Sensor möglich sind. Dafür wurde *B. subtilis* PAL5 mit den bereits in Kapitel 3.2.1.2 genutzten Plasmiden pBS-4nt-SPPel-Cut11, pBS-4nt-SPEpr-Cut11, pBS-4nt-SPBsn-Cut11 bzw. dem pBSMul1 Leervektor transformiert (Kapitel 2.4.5). Die Transformanden wurden in FlowerPlates im BioLector® Mikrobioreaktorsystem für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert während alle 15 Minuten die Biomasse und GFP-Fluoreszenz gemessen wurde (Kapitel 2.4.4.3). Für die Durchführung des *in vivo* Split GFP Assays wurde zu Beginn der Kultivierung das Medium mit 1 % (w/v) Glukose supplementiert und nach 16-stündiger Kultivierung 3 % (v/v) 1x GFP1-10 (Kapitel 2.6.6) zur Detektion hinzugegeben (Kapitel 2.7.3.1). Für eine einfachere Vergleichbarkeit wurde die basale Fluoreszenz der Leervektorkulturen von den Fluoreszenzintensitäten der Expressionskulturen subtrahiert (Kapitel 2.4.4.3; Abb. 3.16A). Zusätzlich wurden am Ende der Kultivierung die Cut11-Aktivitäten im Überstand mit pNPP bestimmt (Kapitel 2.6.4; Abb. 3.16B).

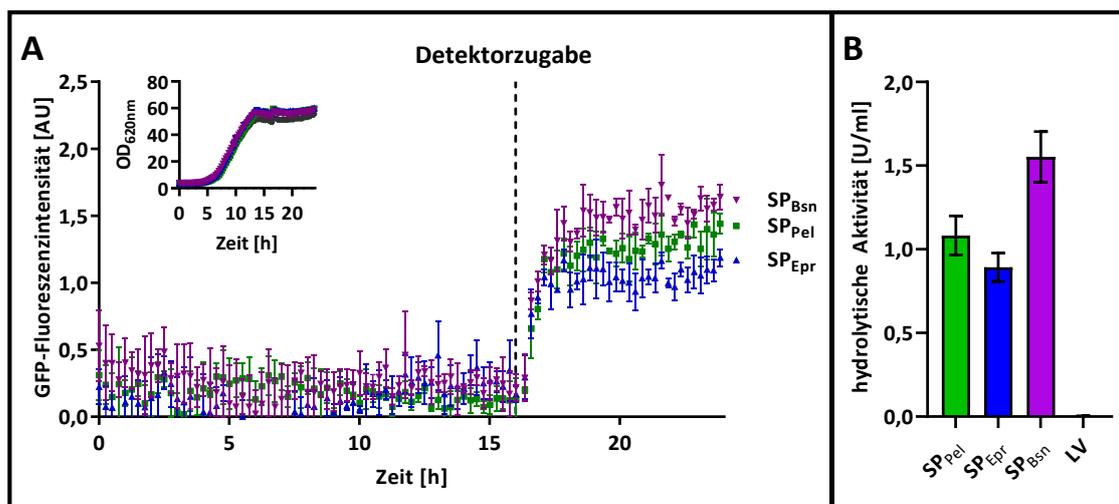


Abb. 3.16: Durch die Nutzung des *in vivo* Split GFP Assays konnte die sekretierte Cut11 quantifiziert werden. **A** Für die Messung der Biomasse und der Cut11-Sekretion wurden *B. subtilis* PAL5 pBS-4nt-SPPel-Cut11 (SP_{Pel}), pBS-4nt-SPEpr-Cut11 (SP_{Epr}), pBS-4nt-SPBsn-Cut11 (SP_{Bsn}) oder pBSMul1 Leervektor (LV) Transformanden, in einem BioLector® Mikrobioreaktorsystem für 24 Stunden in oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM kultiviert. Alle Expressionsplasmide tragen neben einem 4 nt langem RBS-Spacer zwischen SD-Sequenz und Startcodon der $SP_{Epr/Pel/Bsn}$ -cut auch die Sequenz des GFP11-tags am 3'-Ende des Cutinasegens. Da alle beobachteten Kulturen ein ähnliches Wuchsverhalten aufwiesen, wurde zur besseren Trennung von Hintergrundfluoreszenz zu Split GFP-Fluoreszenz die Fluoreszenzwerte des Leervektors von denen der Cut11-sekretierenden Kulturen subtrahiert. Für die Durchführung des *in vivo* Split GFP Assays wurde den Kulturen zur Inokulation 1 % (w/v) Glukose und nach 16-stündiger Kultivierung 3 % (w/v) Detektor (gestrichelte Linie) zugeführt. **B** Auf eine OD_{580nm} von 1 normierte hydrolytische Aktivitäten der im BioLector® Mikrobioreaktorsystem beobachteten Kulturen mit dem kolorimetrischen Substrat pNPP für die Quantifizierung der sekretierten Cut11. Alle Kultivierungen wurden in biologischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurden die Aktivitäten in technischer Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Aufgrund des ähnlichen Wuchsverhaltens konnten die GFP-Fluoreszenzintensitäten der Kulturen direkt miteinander verglichen werden (Abb. 3.16A, Einschub). Wie erwartet, zeigten alle Varianten nahezu kein Fluoreszenzsignal bis zur Zugabe des Detektors nach 16 Stunden (gestrichelte Linie in Abb. 3.16A). Danach stieg die GFP-Fluoreszenz zunächst stark für etwa eine Stunde an, wie es bereits in Abb. 3.13 und Abb. 3.15 gesehen werden konnte. Dies erfolgte wahrscheinlich durch eine hohe Konzentration von bereits sekretierter Cut11 und der damit direkt möglichen Assemblierung des Detektors mit dem GFP11-*tag*. Anschließend nahm die Fluoreszenz langsamer zu, was einer zeitaufgelösten Cutinasesekretion entsprechen könnte. Am Ende der Kultivierung konnte die höchste Fluoreszenz für SP_{Bsn} gemessen werden ($1,64 \pm 0,09$ AU), gefolgt von SP_{Pel} ($1,44 \pm 0,08$ AU) und SP_{Epr} ($1,19 \pm 0,07$ AU). Die am Ende der Kultivierung gemessenen Aktivitäten (Abb. 3.16B) zeigten den gleichen graduellen Verlauf ($SP_{Bsn} > SP_{Pel} > SP_{Epr}$). Damit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass mit der Nutzung des *in vivo* Split GFP Assays die Zielproteinmenge vergleichend detektiert werden kann.

Zusammenfassend konnte in dem Kapitel 3.2.2 eine minimal invasive *in vivo* Anwendungsmöglichkeit des Split GFP Assays etabliert werden. Dafür wurde zunächst mit 16 Stunden nach der Inokulation ein geeigneter Zeitpunkt für die Zugabe des Detektors identifiziert, bevor die Expression von *wprA* durch Zugabe von Glukose reprimiert wurde, womit die Signalintensität gesteigert werden konnte. Mit der indirekten Regulation der *wprA* Expression durch Glukosezugabe über CcpA ist jedoch nur eine maximal 5,5-fache Repression möglich (Marciniak et al., 2012). Für weitere Optimierungen hinsichtlich Signalstärke, Menge und Zugabezeitpunkt des Detektors wäre eine denkbare Vorgehensweise die Deletion des nicht essenziellen *wprA* (Pohl et al., 2013).

Der *in vivo* Split GFP Assay ist damit eine Nachweismethode für nahezu jedes Zielprotein, da nur der kurze GFP11-*tag*, der höchstens minimale Einflüsse auf die Aktivität des Proteins hat (Knapp et al., 2017, Bakkes et al., 2021, Santos-Aberturas et al., 2015), an das Zielprotein fusioniert werden muss. Dadurch, dass der Split GFP Assay eine aktivitätsunabhängige Nachweismethode ist, kann er nur bei Optimierungsverfahren Anwendung finden, welche die Proteinmenge steigern. Bei Verfahren zur Änderung der enzymatischen Eigenschaften wie Stabilität oder Aktivität, ist die Nutzung des Split GFP Assays als alleinige Nachweismethode nicht zu empfehlen. Er eignet sich in solchen Situationen dennoch in Kombination mit aktivitätsbasierten Methoden zur einfachen Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms (Bakkes et al., 2021). Durch die Nutzbarmachung als *in vivo* Methode ist der Assay weitaus zeitsparender als zuvor. Es entfallen die Schritte der Separation von Zellpellet und Überstand und die anschließende mindestens 16-stündige Inkubation zur Ausbildung der holo-GFP-

Fluoreszenz. Da die gleiche relative Menge an GFP1-10 für die *in vivo* Anwendung wie bei der *in vitro* Anwendung genutzt wird, besteht jedoch im größeren Maßstab als bei MTP ein erhöhter GFP1-10 Bedarf. Dahingehend wurde kürzlich ein *fed-batch* Fermentationsverfahren für die einfache Gewinnung von GFP1-10 in sehr hohen Ausbeuten etabliert (Müller et al., 2021a). Bei der Nutzung des Split GFP Assays im Vollmedium war eine hohe Hintergrundfluoreszenz messbar (Abb. 3.13; Abb. 3.15), welche die Nachweisempfindlichkeit des Assays beeinflussen könnte. So konnte selbst die SP_{Epr}-vermittelte Cut11-Sekretion mit nur einem relativ geringen Signal vom Hintergrund getrennt werden (Abb. 3.15), obwohl SP_{Epr} als eines der besten Signalpeptide für die Cutinase in *B. subtilis* gilt (Brockmeier et al., 2006a). Der Sensitivitätsverlust im Bereich von schlecht sekretierenden Varianten stellt jedoch nur einen marginalen Nachteil dar, da bei der Durchführung von Screening-Kampagnen meist die besten Varianten gesucht werden. Zusammenfassend ist die hier entwickelte *in vivo* Anwendung des Split GFP Assays eine mehr als geeignete Methode zur zeit- und kosteneffizienten Hochdurchsatz Proteinmengenbestimmung von sekretierten Proteinen in *B. subtilis*.

3.2.3 Ein kombiniertes Nachweissystem für die Analyse der rekombinanten Proteinsekretion

3.2.3.1 Analyse der Cutinasesekretion durch die simultane Verwendung des Split GFP Assays und des Sekretionsstress-Biosensors

Nach der erfolgreichen Etablierung der Nachweissysteme für die Sekretionsanalyse (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2), wurden beide Methoden für die kombinierte Analyse der Cutinasesekretion simultan in einer Translationsoptimierung genutzt, um die Nutzbarkeit und den Informationsgewinn zu evaluieren. Die Cutinase wurde dafür durch die Verwendung der drei Signalpeptide SP_{PeI}, SP_{Epr} und SP_{Bsn} mit variierenden RBS-Spacern von 4 bis 12 nt (Volkenborn et al., 2020) graduell produziert. Dafür wurde *B. subtilis* PAL5 mit jeweils einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-SP_{PeI}-Cut11, pBS-Xnt-SP_{Epr}-Cut11 oder pBS-Xnt-SP_{Bsn}-Cut11 (Tab. 2.2) transformiert (Kapitel 2.4.5). Die Transformanden wurden anschließend in FlowerPlates für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Dem Medium wurde zur Durchführung des *in vivo* Split GFP Assays zu Beginn 1 % (w/v) Glukose zugeführt und zusätzlich wurden nach 16-stündiger Kultivierung 3 % (v/v) 1x GFP1-10 zugegeben (Kapitel 2.7.3.1). Es erfolgte die *in vivo* Messung der mCherry-Fluoreszenz und der Split GFP-Fluoreszenz und die *in vitro* Aktivitätsbestimmung mit pNPP (Kapitel 2.7.3.1, 2.7.4 und 2.6.4). Anschließend wurden alle Werte für eine einfachere Vergleichbarkeit jeweils auf

die Variante mit 4 nt langem Spacer und dem Signalpeptid SP_{Pel} (4nt-SP_{Pel}) normiert und zusammen aufgetragen (Abb. 3.17).

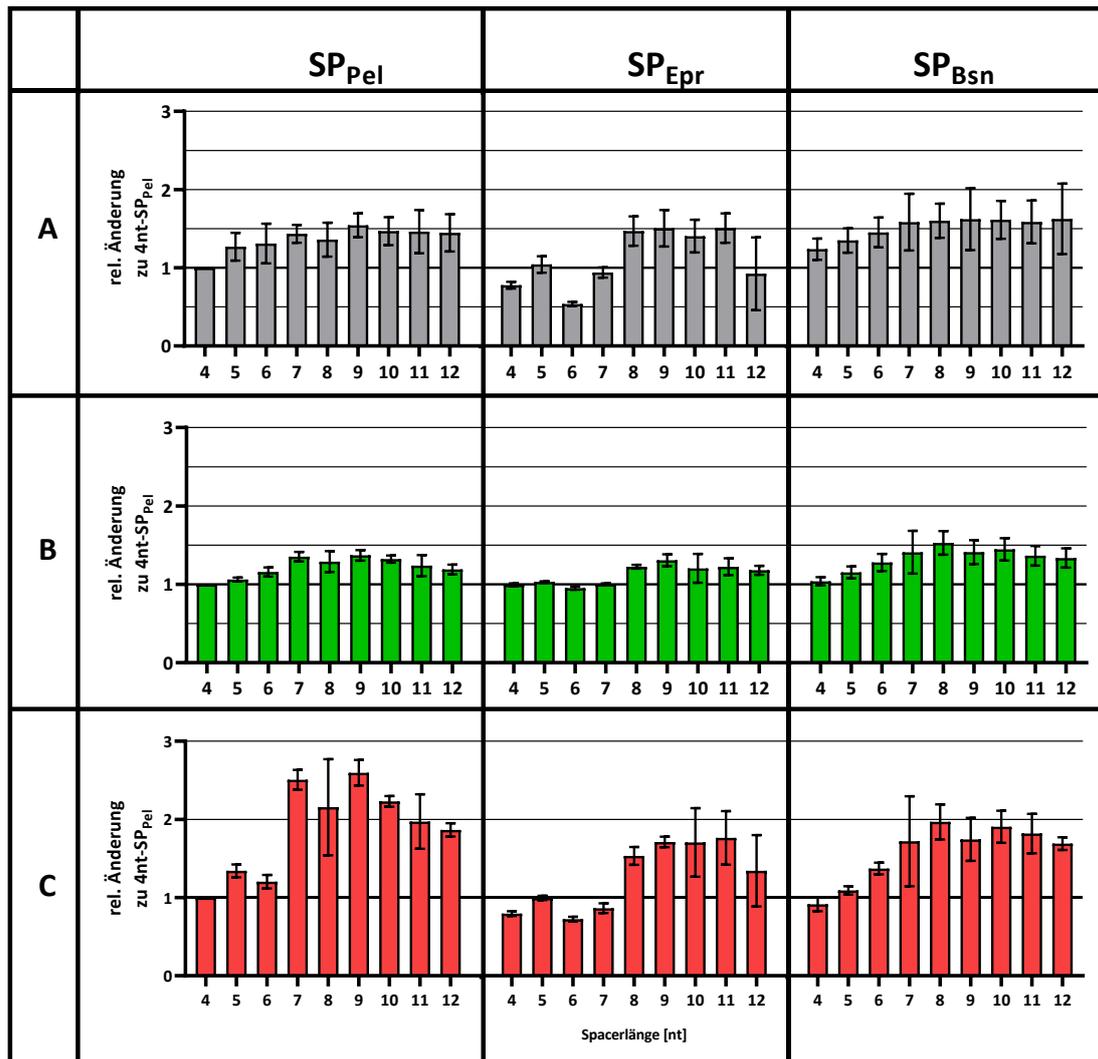


Abb. 3.17: Analyse der Cutinasesekretion bei einer Translationsoptimierung. Für die Analyse wurde *B. subtilis* PAL5 mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-SP_{Pel}-Cut11 (SP_{Pel}), pBS-Xnt-SP_{Epr}-Cut11 (SP_{Epr}) oder pBS-Xnt-SP_{Bsn}-Cut11 (SP_{Bsn}) transformiert. Die genutzten Plasmidserien unterscheiden sich hinsichtlich der Signalsequenzen und der RBS-Spacer zwischen SD-Sequenz und Startcodon der *cut11*, es wurden RBS-Spacer von 4 bis 12 nt verwendet (angezeigt durch die Xnt im Plasmidnamen). Die Transformanten wurden für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM in FlowerPlates® kultiviert. Für die Nutzung des *in vivo* Split GFP Assays wurde zu Kultivierungsbeginn 1 % (w/v) Glukose den Kulturen zugeführt. Zusätzlich wurde nach 16-stündiger Kultivierung noch 3 % (w/v) Detektor hinzugegeben. **A** Die enzymatische Aktivität der Kulturen wurde nach der Kultivierung mit *pNPP* bestimmt. **B** Die sekretierte Cut11 wurde über den minimal invasiven *in vivo* Split GFP Assay bestimmt. **C** Der Sekretionsstress wurde über die mCherry-Fluoreszenzintensität der Kulturen bestimmt. Alle durchgeführten Messungen wurden auf die pBS-4nt-SP_{Pel}-Cut11-Variante (4nt-SP_{Pel}) normiert. Die Kultivierungen wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt. Zusätzlich wurden bei den Aktivitätsmessungen technische Triplikate verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der biologischen Replikate als Fehlerbalken.

Wie zu erwarten war, konnte mit der Verlängerung des RBS-Spacers von 4 auf 8 bzw. 9 nt die Cut11-Sekretion für jedes Signalpeptid maximal gesteigert werden. Der minimal invasive *in vivo* Split GFP Assay zeigte eine gute Korrelation mit der gemessenen Aktivität über alle Messungen hinweg ($r=0,85$; $R^2=0,73$; Abb. 7.7A im Anhang). Wie bereits erwartet, nahm die Sensitivität des

in vivo Split GFP Assays im Bereich von schlecht sekretierten Varianten im Vergleich zur *in vitro* Anwendung deutlich ab, ersichtlich an ähnlichen Split GFP-Fluoreszenzen für die SP_{Epr}-Varianten mit 4 bis 6 nt bei unterschiedlichen Aktivitäten (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Aus Abb. 3.17 entnommene Split GFP-Fluoreszenzintensitäten und Aktivitäten zur Verdeutlichung des Sensitivitätsverlustes des *in vivo* Split GFP Assays.

	4nt-SP _{Epr}	5nt-SP _{Epr}	6nt-SP _{Epr}
Split GFP-Fluoreszenz [normiert auf 4nt-SP _{Pel}]	1,00 ± 0,02	1,03 ± 0,01	0,95 ± 0,02
Aktivität [normiert auf 4nt-SP _{Pel}]	0,78 ± 0,04	1,04 ± 0,10	0,54 ± 0,03

Im Vergleich zu den bisher durchgeführten Messungen des Sekretionsstress bei verschiedenen Signalpeptiden (Abb. 3.12) konnte bei der Variation der TIR bei jedem Signalpeptid eine Korrelation zwischen Aktivität und gemessenem Stress nachgewiesen werden (Tab. 3.2; Abb. 7.7B-D im Anhang).

Tab. 3.2: Kalkulierte Korrelationen nach Pearson und dazugehörige Bestimmtheitsmaße zwischen hydrolytischer Aktivität und Sekretionsstress bei variierenden RBS-Spacern.

	Xnt-SP _{Pel}	Xnt-SP _{Epr}	Xnt-SP _{Bsn}
Korrelation [r]	0,84	0,92	0,96
Bestimmtheitsmaß [R ²]	0,71	0,85	0,92

Die Korrelationen zwischen Sekretionsstress und enzymatischer Aktivität waren für SP_{Epr} und SP_{Bsn} ähnlich gut (r=0,92 zu r=0,96). Für die SP_{Pel}-Varianten waren Stress- und Aktivitätsprofil ähnlich, jedoch war die Zunahme des Sekretionsstress ab einer Spacerlänge von 7 nt deutlich höher als die Zunahme der Aktivität. Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass die Ausgangsvariante von SP_{Pel} mit einem RBS-Spacer von 4 nt bereits eine zehnfach höhere TIR als 4nt-SP_{Epr} oder 4nt-SP_{Bsn} aufwies und nochmal eine deutliche Steigerung zwischen 6 und 7 nt kalkuliert wurde (Volkenborn et al., 2020), wodurch das extrazelluläre Chaperon PrsA überladen war. Damit würde ab einer gewissen Translationseffizienz die PrsA Menge die Sekretion von aktiver Cut11 limitieren (Sarvas et al., 2004). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass selbst bei wieder sinkender TIR mit RBS-Spacern über 9 nt (Volkenborn et al., 2020) der Sekretionsstress sinkt, die Aktivität aber konstant bleibt. Bei der gleichzeitigen Betrachtung von sekretierter Cut11 und der dabei entstandenen zellulären Stressantwort konnte beobachtet werden, dass bei der Translationsoptimierung bei ähnlichen maximalen Cut11-Mengen unterschiedlich starke Stressantworten messbar waren. So zeigte weiterhin SP_{Pel} bei einem 9 nt langen RBS-Spacer eine im Vergleich zu den beiden anderen Signalpeptiden mit gleicher RBS-Spacerlänge deutlich erhöhte Stressantwort (SP_{Pel}: 2,60 ± 0,16; SP_{Epr}: 1,71 ± 0,07; SP_{Bsn}: 1,74 ± 0,27). Anhand der hier durchgeführten Analyse könnte vermutet werden, dass der Sekretionsstress mit dem Optimierungspotenzial einer Variante in

Verbindung stehen könnte. So konnte die Menge an aktiver Cut11 im Überstand bei SP_{Epr}, welches in seiner 4nt-Ausgangsvariante im Vergleich zu SP_{PeI} und SP_{Bsn} das geringste Stresssignal aufwies, durch die Verwendung verschiedener RBS-Spacer zweifach gesteigert werden, wohingegen für SP_{PeI} eine 1,5-fache Steigerung und für SP_{Bsn} eine 1,3-fache Steigerung mit dem optimalen RBS-Spacer möglich war. Dennoch muss auch an dieser Stelle gesagt werden, dass der Prozess der rekombinanten Produktion und Sekretion von Proteinen zu komplex ist, um ihn mit der hier erzeugten Datenmenge vollends ergründen zu können. Unabhängig davon konnten beide Nachweismethoden einfach miteinander kombiniert werden und lieferten einen detaillierteren Einblick in den Prozess der rekombinanten Proteinsekretion, wodurch Varianten identifiziert werden konnten, die zu einer verbesserten Sekretion bei gleichzeitig geringerem Stresslevel führten.

3.2.3.2 Die Nutzung des *in vivo* Split GFP Assays in Kombination mit dem Biosensorstamm *B. subtilis* PAL5 zur Vereinfachung und Erweiterung von Screening-Kampagnen

Zur Überprüfung der Nutzbarkeit des kombinierten Nachweissystem im Hochdurchsatz wurde ein exemplarisches Signalpeptid-Screening für die Cutinase durchgeführt. Da es keine Vorhersagemöglichkeiten für passende Kombinationen von Signalpeptiden mit Zielproteinen gibt, ist das Signalpeptid-Screening meist die erste anzuwendende Methode bei der Etablierung der rekombinanten Sekretion eines neuen Zielproteins (Brockmeier et al., 2006a, Mathiesen et al., 2009, Degering et al., 2010). Die Durchführung eines Signalpeptid-Screenings war zusätzlich noch interessant, da in Kapitel 3.2.1.2 festgestellt wurde, dass es bisher keine eindeutigen Beweise gibt, ob der Sekretionsstress-Biosensor als alleinige Zielproteinnachweismethode für Signalpeptid-Screenings geeignet ist.

Zur Erzeugung der Signalpeptid-Bank wurde *cut11* hydrolytisch unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen EcoRI und XbaI aus dem Plasmid pBS-4nt-SP_{Epr}-Cut11 isoliert (Kapitel 2.5.9), bevor es in ein ebenfalls mit diesen Enzymen hydrolysierte Signalpeptid-Bank (pBSMul1(SPBox)-LipA; Tab. 2.2) mittels Ligation integriert wurde (Kapitel 2.5.11). *B. subtilis* PAL5 wurde anschließend mit dieser Signalpeptid-Bank transformiert (Kapitel 2.4.5), bevor etwa 500 Transformanden, welche jeweils eine SP-Cut11 Fusion beinhalteten, in MTP für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert wurden (Kapitel 2.4.4.2). Für die Durchführung des *in vivo* Split GFP Assays wurde zu Kultivierungsbeginn 1 % (w/v) Glukose zugegeben und nach 16-stündiger Kultivierung noch 3 % (v/v) 1x GFP1-10 (Kapitel 2.7.3.1). Am Ende der Kultivierung wurden *in vivo* Fluoreszenzmessungen des Split GFP Assays und des Sekretionsstresses (Kapitel 2.7.3.1 und 2.7.4) sowie die Aktivitätsbestimmung mit pNPP

(Kapitel 2.6.4) durchgeführt. Anschließend wurden alle Messdaten auf eine 4nt-SP_{Pel} Kontrolle normiert (Abb. 3.18A).

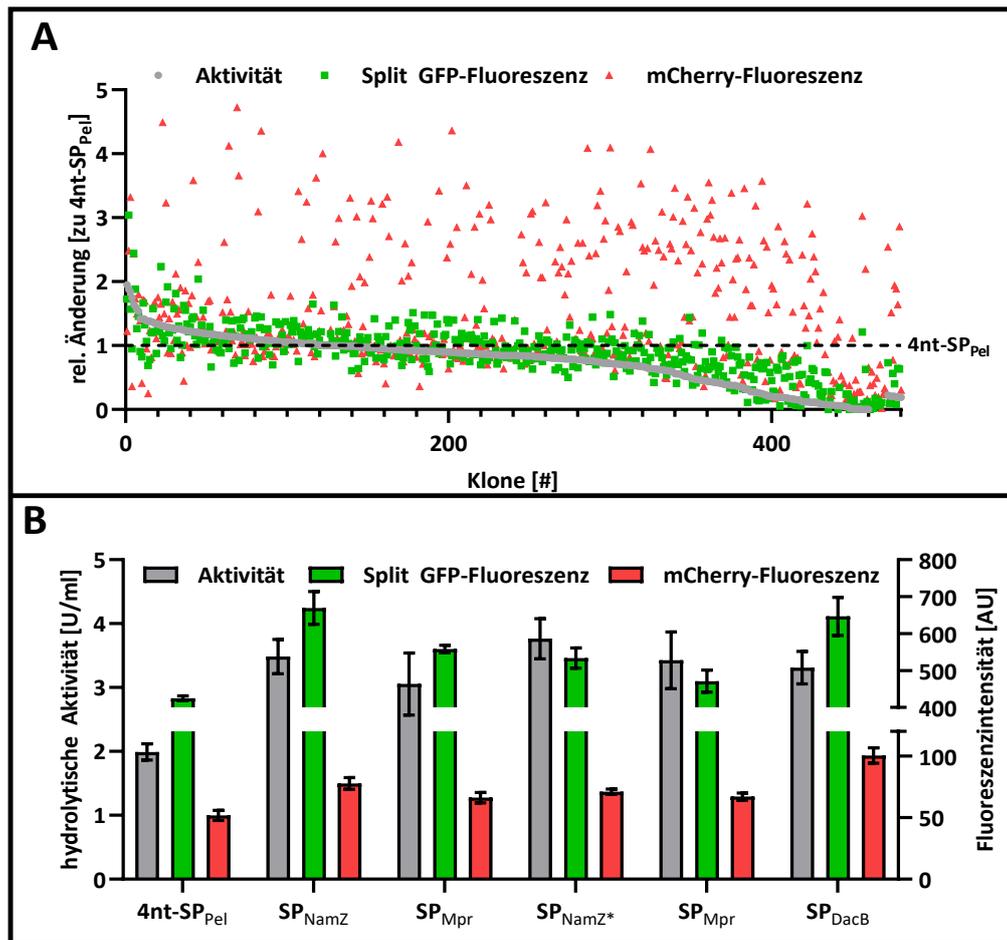


Abb. 3.18: Signalpeptid-Screening der Cut11. **A** Das *cut11* Gen wurde am 5'-Ende an eine homologe Signalsequenz-Bibliothek fusioniert. Anschließend wurde *B. subtilis* PAL5 mit dieser Bibliothek transformiert und 480 Klone wurden in MTP für 24 Stunden in 150 μ l oLB-Medium bei 30°C und 900 UpM kultiviert. Zur Durchführung des *in vivo* Split GFP Assays wurde zu Kultivierungsbeginn 1 % (w/v) Glukose und nach 16 Stunden 3 % (v/v) 1x GFP1-10 hinzugefügt. Nach der Kultivierung wurden Aktivitätsmessungen mit *pNPP* (grau), der *in vivo* Split GFP Assay (grün) und Messungen des Stresslevels (rot) durchgeführt. Alle Messwerte wurden auf eine pBS-4nt-SP_{Pel}-Cut11 Variante (4nt-SP_{Pel}) normiert. **B** Die besten fünf Stämme hinsichtlich der gemessenen hydrolytischen Aktivität wurden ausgewählt. Sie wurden erneut angezogen, die Plasmide isoliert und *B. subtilis* PAL5 wurde mit einem der fünf Plasmide bzw. der 4nt-SP_{Pel}-Cut11 Kontrolle transformiert. Die Transformanten wurden für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM in FlowerPlates® kultiviert. Erneut wurde für den *in vivo* Split GFP Assay 1 % (w/v) Glukose zu Beginn der Kultivierung hinzugegeben. Nach 16 Stunden erfolgte die Zugabe von 3 % (v/v) GFP1-10. Nach der Kultivierung wurden die hydrolytischen Aktivitäten (grau) mit *pNPP* bestimmt. Ebenfalls wurde der Sekretionsstress über die mCherry-Fluoreszenz (rot) und die sekretierte Cut11 über den *in vivo* Split GFP Assay (grün) ausgelesen. Alle Werte wurden auf eine OD_{580nm} von 1 normiert. Zusätzlich wurden die fünf isolierten Plasmide zur Identifikation der Signalsequenzen sequenziert. Die Verifizierung der fünf besten Varianten wurde in biologischer und technischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dazugehörigen Standardabweichungen der biologischen Replikate als Fehlerbalken.

Durch die Messung einer großen Probenanzahl konnte erneut die gute Korrelation zwischen Split GFP Assay und enzymatischer Aktivität gemessen werden ($r=0,77$; $R^2=0,61$; Abb. 7.8A im Anhang). Wie bereits bei den drei Signalpeptiden SP_{Pel}, SP_{Epr} und SP_{Bsn} exemplarisch gezeigt

(Abb. 3.12), korrelierten auch bei der Messung von fast 500 Klonen Sekretionsstress und Aktivität bei unterschiedlichen Signalpeptiden nicht ($r=0,11$; $R^2=0,01$; Abb. 7.8B im Anhang). Damit konnte bewiesen werden, dass der Sekretionsstress-Biosensor als alleinige Nachweismethode für die Zielproteinmenge bei Signalpeptid-Screenings nicht geeignet ist.

Bei Signalpeptid-Screenings die nur in biologischen Einfachbestimmungen durchgeführt werden und somit einer großen statistischen Schwankung unterliegen, werden die besten Varianten nochmals validiert (Fu et al., 2018). In diesem Fall wurden die fünf Varianten mit der höchsten Aktivität für die Validierung ausgewählt. Dafür wurden die Varianten unter Standardbedingungen in Reagenzgläsern angezogen (Kapitel 2.4.4.1), bevor die Plasmide isoliert (Kapitel 2.5.6) und sequenziert (Kapitel 2.5.12) wurden. *B. subtilis* PAL5 wurde mit jeweils einem der isolierten Plasmide erneut transformiert (Kapitel 2.4.5) und die Transformanten wurden unter Standardbedingungen für 24 Stunden in FlowerPlates kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Anschließend wurden zusätzlich zum Sekretionsstress (Kapitel 2.7.4) die sekretierte Cut11 über die enzymatische Aktivität (Kapitel 2.6.4) und den *in vivo* Split GFP Assay (Kapitel 2.7.3.1) ausgelesen (Abb. 3.18B). Jeweils zwei der besten fünf Varianten waren Cut11-Fusionen mit dem Signalpeptid der Metalloprotease Mpr (SP_{Mpr} ; Mäder et al., 2002) bzw. dem Signalpeptid der erst kürzlich beschriebenen exo- β -N-Acetylmuramidase NamZ (SP_{NamZ} ; Müller et al., 2021b). Zusätzlich war noch das Signalpeptid der D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase DacB (SP_{DacB} ; Buchanan et al., 1992) vertreten. Alle Varianten zeigten, wie zu erwarten war, ähnlich hohe Aktivitäten und Split GFP Signale. Die Variante SP_{NamZ^*} zeigte eine im Vergleich zu SP_{NamZ} reduzierte Split GFP-Fluoreszenz. Bei der Sequenzierung dieser Variante wurde jedoch eine Punktmutation im GFP11-tag festgestellt, die zu dem Aminosäureaustausch A252S führt, welcher die Rekonstitution zum holo-GFP stören könnte. Die mCherry-Fluoreszenzintensitäten zeigten im Vergleich zu den Aktivitäten und Split GFP-Fluoreszenzintensitäten eine höhere Varianz, wobei SP_{DacB} mit $100,48 \pm 6,26$ AU das deutlich höchste messbare Stresssignal zeigte. Normalerweise würde nach der Verifizierung die Variante mit der größten Proteinausbeute für weitere Optimierungsschritte ausgewählt werden. In Falle dieses Screenings wären das bei der reinen Betrachtung der Split GFP-Signale die Varianten SP_{DacB} oder SP_{NamZ} . Durch die gleichzeitige Messung des Sekretionsstress könnte eine begründetere Entscheidung getroffen werden, wobei sich die Auswahl des Signalpeptides mit dem geringeren Stresssignal und der damit effizienteren Sekretion anbieten würde. In dem Fall dieses Screenings wäre dies SP_{NamZ} , was bei gleicher Zielproteinmenge einen messbaren Stress von nur $77,71 \pm 4,76$ AU zeigte. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl der *in vivo* Split GFP Assay als auch der Sekretionsstress als kombinierte Methoden im Hochdurchsatz erfolgreich verwendet werden

konnten und somit relativ einfach eine tiefgreifende Analyse zur Auswahl von optimierungswürdigen Varianten durchgeführt werden könnte.

Zusammenfassend konnte in Kapitel 3.2.3 die beiden in Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.2 etablierten *in vivo* Nachweismethoden kombiniert werden. Damit ist es möglich gleichzeitig aktivitätsunabhängig das sekretierte Zielprotein und den dabei entstehenden Sekretionsstress auszulesen. Der Split GFP Assay zeigte durchweg eine gute Korrelation mit der enzymatischen Aktivität, auch wenn die Vermutung des Sensitivitätsverlustes aus Kapitel 3.2.2 hinsichtlich schlecht sekretierenden Varianten bestätigt wurde (Abb. 3.17). Für den Sekretionsstress-Biosensor konnte gezeigt werden, dass bei der Betrachtung unterschiedlicher Signalpeptide für ein Zielprotein anhand eines Signalpeptid-Screenings für Cut11 keine Korrelation zwischen Sekretionsstress-Signal und sekretierter Zielproteinmenge besteht (Abb. 3.18). Bei Optimierungskampagnen, bei denen nur einzelne Stellschrauben der Proteinbiosynthese oder Sekretion verändert werden, wie der Translationsoptimierung in Kapitel 3.2.3.1 über die Variation der RBS-Spacer konnten Korrelationen zwischen sekretiertem Zielprotein und Sekretionsstress gemessen werden (Abb. 3.17). Damit könnte der *B. subtilis* Sekretionsstress-Biosensor auch für solche Optimierungskampagnen in Verbindung mit dem FACS genutzt werden, wie es für den Sensorstamm *C. glutamicum* K9 erfolgreich bei dem Screening einer über *error-prone* PCR erzeugten Mutagenesebank eines Signalpeptides gezeigt werden konnte (Bakkes et al., 2021). Anhand dieser Ergebnisse konnte aufgezeigt werden, dass beide Methoden problemlos auch im Hochdurchsatz kombiniert werden können, wodurch eine zielgerichtete Auswahl von weiter zu beobachtenden Varianten möglich ist.

Zusammenfassung

Kombinierte Nachweismethoden zur Analyse sekretierter Proteine in *B. subtilis*

- Mit den Stämmen *B. subtilis* PAL4 und *B. subtilis* PAL5 konnten erfolgreich zwei Sekretionsstress-Biosensoren konstruiert werden, die den Sekretionsstress über die *sfGFP*- bzw. *mCherry*-Fluoreszenz auslesbar machten.
- Sekretionsstress und Zielproteinmenge zeigten keine Korrelation bei der Betrachtung von unterschiedlichen Signalpeptiden für das gleiche Zielprotein.
- Der Split GFP Assay konnte als eine *in vivo* und im BioLector auslesbare Nachweismethode für sekretierte Proteine nutzbar gemacht werden, indem GFP1-10 erst nach 16-stündiger Kultivierung zugeführt wurde.
- Die Degradation von GFP1-10 im *B. subtilis* Überstand der exponentiellen Wachstumsphase führte zu einem geringen Fluoreszenzsignal des *in vivo* Split GFP Assays. Die Protease WprA konnte als Grund identifiziert werden.

- Durch die Repression der *wprA* Expression mittels Glukose konnte die Fluoreszenzintensität des *in vivo* Split GFP Assays verbessert werden.
- Der *in vivo* Split GFP Assay und die Messung des Sekretionsstresses durch *B. subtilis* PAL5 konnten sowohl für Sekretionsanalysen im kleinen Maßstab als auch für Hochdurchsatz-abhängige Screening-Kampagnen kombiniert werden, wodurch eine deutlich tiefere Analyse der Sekretion möglich war.

3.3 Ein kombiniertes Nachweissystem für die rekombinante Produktion und Sekretion von Proteinen

Nachdem in den letzten Kapiteln die Einzelmethoden zur *in vivo* Detektion von sowohl intrazellulären (Kapitel 3.1) als auch sekretierten Proteinen (Kapitel 3.2.2) und der damit einhergehenden zellulären Stressantwort (Kapitel 3.2.1) erfolgreich entwickelt und etabliert werden konnten, wurde überprüft, ob diese drei Methoden zu einem kombinatorischen Drei-Sensor-System für die Analyse der rekombinanten Produktion von Proteinen zusammengefügt werden können

3.3.1 Ein Drei-Sensor-Nachweissystem ist durch die Kombination der Fluoreszenzreporter P4, sfGFP und mCherry möglich

Seit der Entdeckung des aus der Qualle *Aequoria victoria* stammenden GFP (Shimomura et al., 1962) konnten im Laufe der Jahre durch Mutagenese viele neue Fluoreszenzproteine mit verschiedenen Fluoreszenzfarben wie das cyan fluoreszierende Protein (CFP) (Heim et al., 1994) oder das gelb fluoreszierende Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP) konstruiert werden (Ormö et al., 1996, Shaner et al., 2005, Kremers et al., 2011, Lambert, 2019). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass zu GFP analoge Detektorproteine mit anderen Fluoreszenzeigenschaften ebenfalls mit dem GFP11-tag zu holo-Fluoreszenzproteinen rekonstituieren können (z.B. holo-CFP und holo-YFP; Kamiyama et al., 2016). Da für die simultane Nutzung des Split GFP-Sensorprinzips für die Detektion intra- und extrazellulärer Proteine in einem kombinierten System Reporterproteinvarianten mit deutlich voneinander unterscheidbaren spektralen Eigenschaften unabdingbar sind, war der nächste Schritt dieser Arbeit zu prüfen, ob zusätzliche Detektorvarianten für den extrazellulären Nachweis genutzt werden können. Aus diesem Grund wurden die beiden prominenten GFP-Derivate YFP (gelb) und CFP (cyan) als Detektorvarianten anhand der durch das Signalpeptid der Protease NprE (Kallio et al., 1991) sekretierten Cut11 evaluiert. Dafür wurde *E. coli* BL21(DE3) mit einem der

Plasmide pET22b-YFP1-10 oder pET22b-CFP1-10 (Tab. 2.2) transformiert (Kapitel 2.4.3) bevor die Detektorproteine produziert und aus Einschlusskörperchen gereinigt wurden (Kapitel 2.6.6). Für die Cutinasesekretion wurde *B. subtilis* DB430 mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-SP_{NprE}-Cut11 (Tab. 2.2) transformiert (Kapitel 2.4.5). Für die Konstruktion dieser Plasmidserie, mit einem variablen RBS-Spacer von 4 bis 12 nt und dem Signalpeptid der Protease NprE, wurde das *cut11*-Fragment durch die Hydrolyse mit den Enzymen EcoRI und XbaI aus dem Plasmid pBS-4nt-SPPel-Cut11 isoliert (Kapitel 2.5.9) und dann in den auf die gleiche Weise hydrolysierten Vektor pBSMul1-SPMix-SPNprE-EXLX1-GFP11 (Kapitel 2.5.9; Tab. 2.2) ligiert (Kapitel 2.5.11). Das dabei entstandene Plasmid trug eine SP_{NprE}-Cut11 Fusion, die mit dem Primerpaar fw-NdeI-SPNprE und Rev-GFP11-XbaI (Tab. 2.3) mittels PCR amplifiziert wurde (Kapitel 2.5.1), wobei primervermittelt die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NdeI und XbaI angefügt wurden. Dieses Fragment wurde ebenso wie die Plasmidserie pBS-4nt-GUS11 mit den Enzymen NdeI und XbaI hydrolysiert (Kapitel 2.5.9), bevor SP_{NprE}-Cut11- und Vektor-Fragment zur Plasmidserie pBS-Xnt-SP_{NprE}-Cut11 ligiert wurden (Tab. 2.2; Kapitel 2.5.11). Dieses Signalpeptid ist in einer Kooperation innerhalb des CLIB-Kompetenzzentrums Biotechnologie mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Roland Freudl und Prof. Dr. Marco Oldiges evaluiert worden, wobei festgestellt werden konnte, dass durch die Variation des RBS-Spacers die Menge an aktiv sekretierter Cut11 um das 30-fache gesteigert werden konnte. Aus diesem Grund eignete sich diese Plasmidserie besonders zur Evaluierung der Nachweisempfindlichkeit für die extrazelluläre Detektion mit neuen Detektorvarianten. Die Transformanden wurden unter Standardbedingungen für 24 Stunden in FlowerPlates kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Für die Evaluierung wurden nach der Kultivierung die hydrolytischen Aktivitäten der Cut11-Varianten im Kulturüberstand mit pNPP (Kapitel 2.6.4; Abb. 7.9A im Anhang) bestimmt. Zusätzlich wurde die Cut11 mit den zuvor gereinigten Detektorvarianten im Überstand nachgewiesen (Kapitel 2.7.3.1; Abb. 7.9B+C im Anhang). Für eine einfachere Evaluierung wurden die Fluoreszenzintensitäten der YFP- und CFP-Detektorvarianten mit den Aktivitäten der Cut11 korreliert dargestellt (Abb. 3.19). Die Messparameter wurden von bereits publizierten Reportervarianten aus der FPbase übernommen (Lambert, 2019).

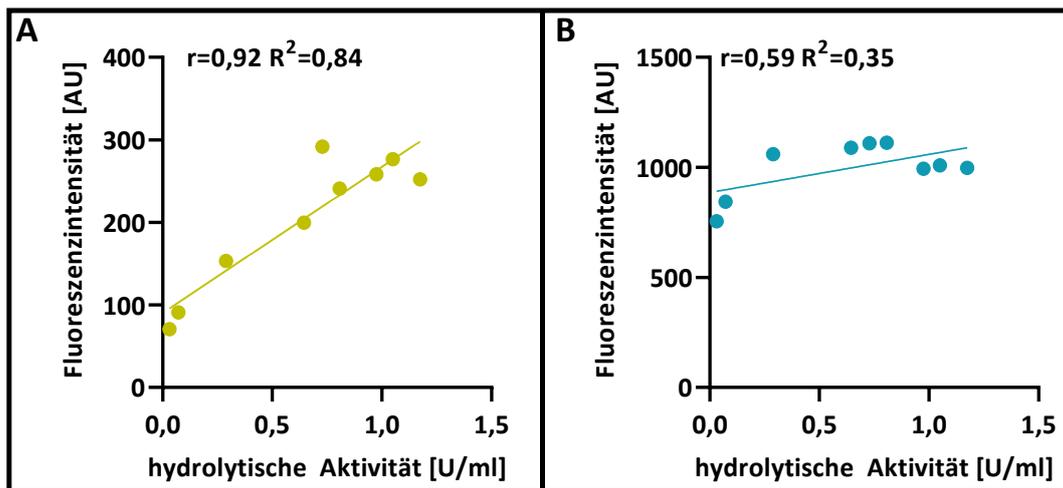


Abb. 3.19: Evaluierung der cyan und gelb fluoreszierenden Detektorvarianten für den Nachweis extrazellulärer Cut11. Dargestellt sind die Korrelationen zwischen der hydrolytischen Aktivität der Cut11 und der dazu gehörenden Fluoreszenzintensitäten **A** bei Nutzung des YFP-Detektors oder **B** bei Nutzung des CFP-Detektors beim Split FP-basierten Nachweis extrazellulärer Proteine. Zusätzlich wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r ; Pearson, 1895) und die Regressionsgeraden (R^2) berechnet. Zur Gewinnung der Daten wurde *B. subtilis* DB430 mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-SP_{NprE}-Cut11 transformiert. Bei der Plasmidserie pBS-Xnt-SP_{NprE}-Cut11 wurde für die Nutzung des Split FP-basierten Nachweises die DNA-Sequenz des GFP11-tags an das 3'-Ende der *cut* fusioniert. Die Sekretion der Cut11 wird durch das Signalpeptid der Protease NprE vermittelt. Zusätzlich wurden RBS-Spacer von 4 bis 12 nt (im Namen der Plasmidserie dargestellt durch Xnt) zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon der *cut11* verwendet. Die Transformanten wurden für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM kultiviert, bevor die hydrolytischen Aktivitäten der Cut11 im zellfreien Kulturüberstand mit *p*NPP gemessen wurden. Neben der Aktivitätsmessung wurde die Cut11 im Kulturüberstand durch Verwendung des YFP-Detektors bzw. des CFP-Detektors Split FP-basiert nachgewiesen. Hydrolytische Aktivitäten und Fluoreszenzintensitäten wurde auf eine OD_{580nm} von 1 normiert (Abb. 7.9 im Anhang). Die Messungen wurden in biologischen und technischen Triplikaten durchgeführt.

Bei der Nutzung des YFP-Detektors konnte über den gesamten Messbereich eine starke Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und hydrolytischer Aktivität der Cut11 beobachtet werden ($r=0,92$; $R^2=0,84$). Die Nachweisempfindlichkeit nahm im Bereich der Varianten, die eine geringe Cut11 Aktivität hatten, ab. Dennoch konnten Hintergrundfluoreszenz und YFP-Fluoreszenz unterschieden werden (LV: $63,8 \pm 2,4$ AU; 4nt-Cut11: $70,6 \pm 2,1$ AU aus Abb. 7.9B im Anhang). Bei der Verwendung des CFP-Detektors korrelierten die gemessenen Cut11 Aktivitäten und die Fluoreszenzintensitäten deutlich schlechter als beim YFP-Detektor ($r=0,59$; $R^2=0,35$). Zusätzlich konnte die geringen Signale der 4 und 5 nt Varianten nicht von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden (LV: $763,60 \pm 32,31$ AU; 4nt-Cut11: $754,90 \pm 42,07$ AU aus Abb. 7.9C im Anhang). Ein Grund für die hohe Hintergrundfluoreszenz und die generell schlechte Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und enzymatischer Aktivität bei der CFP-Detektorvariante könnte ein kombinatorischer Effekt aus einzelnen Faktoren sein. So weist CFP im Vergleich zu YFP und GFP eine verringerte Fluoreszenzhelligkeit auf (Patterson et al., 2001, Pédelacq et al., 2005). Zusätzlich absorbieren und emittieren sowohl das

Kulturmedium als auch intrazelluläre Moleküle von *B. subtilis*, welche während der Kultivierung durch Zelllyse in den Überstand gelangt sein können, in einem ähnlichen Bereich wie CFP (Hill et al., 2009).

Nach der Evaluierung des YFP- und CFP-Detektors für die extrazelluläre Split FP-basierte Detektion der Cut11, wurde überprüft, ob diese beiden Detektorvarianten sich ebenfalls für die intrazelluläre *in vivo* Detektion von Zielproteinen am Beispiel der GUS11 nutzen lassen. Dafür wurden zunächst die Detektorplasmide für die Koproduktion (Kapitel 3.1) konstruiert. Das Plasmid pHT01-iSplitCFP (Tab. 2.2) wurde durch die Punktmutation Y66W (Heim et al., 1994) im Plasmid pHT01-iSplitGFP erzeugt. Diese wurde durch eine QuikChange®-PCR (Kapitel 2.5.2) mit den Primern QC-fw-Y66W und QC-rev-Y66W (Tab. 2.3) eingefügt. Für die Konstruktion von pHT01-iSplitYFP (Tab. 2.2) wurde das selbe Ausgangsplasmid durch zwei Aminosäureaustausche, Q69K und T203Y (Ormö et al., 1996), mutiert. Dafür wurde zunächst mit dem Primerpaar QC-fw-Q69K/QC-rev-Q69K und anschließend mit dem Primerpaar QC-fw-T203Y/QC-rev-T203Y (Tab. 2.3) das Plasmid pHT01-iSplitGFP per QuikChange®-PCR amplifiziert (Kapitel 2.5.2). Anschließend wurde *B. subtilis* DB430 mit einem der konstruierten Detektorplasmide und zusätzlich mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 transformiert (Kapitel 2.4.5). Die jeweiligen Doppeltransformatanten wurden für 24 Stunden unter Standardbedingungen in FlowerPlates kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Zur Induktion der Expression des jeweiligen Detektors wurden die Kulturen zu Kultivierungsbeginn mit 1 mM IPTG supplementiert. Im Anschluss an die Kultivierung wurde zum einen die hydrolytische Aktivität der Zelllysate mit pNPG (Kapitel 2.6.5) und zusätzlich die YFP- bzw. CFP-Fluoreszenzintensitäten ausgelesen (Kapitel 2.7.3.2; Abb. 7.10A+B im Anhang). Für eine einfachere Evaluierung wurden erneut die Aktivitäten der Cut11 mit den Fluoreszenzintensitäten der YFP- und CFP-Detektorvarianten korreliert dargestellt (Abb. 3.20A+B).

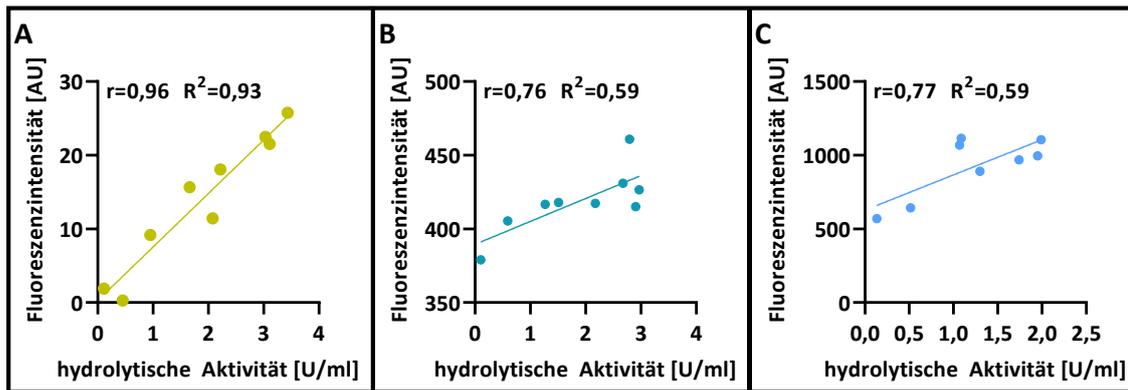


Abb. 3.20: Evaluierung der cyan, gelb und blau fluoreszierenden Detektorvarianten für den Nachweis intrazellulärer GUS11. Dargestellt sind die Korrelationen zwischen der hydrolytischen Aktivität der GUS11 im Zellysate und der dazu gehörenden Fluoreszenzintensitäten **A** bei Nutzung des YFP-Detektors, **B** des CFP-Detektors oder **C** des P4-Detektors beim Split FP-basierten *in vivo* Nachweis intrazellulärer Proteine. Zusätzlich wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r ; Pearson, 1895) und die Regressionsgeraden (R^2) berechnet. Zur Gewinnung der Daten wurde *B. subtilis* DB430 mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 und einem der Detektorplasmide pHT01-iSplitYFP (**A**), pHT01-iSplitCFP (**B**) oder pHT01-iSplitP4 (**C**) transformiert. Bei der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 wurde für die Nutzung des Split FP-basierten Nachweises die DNA-Sequenz des GFP11-tags an das 3'-Ende der *gus* fusioniert. Zusätzlich wurden RBS-Spacer von 4 bis 12 nt (bei **C** bis 11 nt) zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon der *gus11* verwendet (im Namen der Plasmidserie dargestellt durch Xnt). Die Transformanten wurden für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM kultiviert. Für die Induktion der Expression des Detektorgens wurde das Medium zusätzlich mit 1 mM IPTG versetzt. Nach der Kultivierung wurden die hydrolytischen Aktivitäten der GUS11 im Zellysate mit pNPG gemessen. Zusätzlich wurde die GUS11 iSplit FP-basiert über die intrazelluläre Fluoreszenz der holo-Reporterproteinvariante nachgewiesen. Hydrolytische Aktivitäten und Fluoreszenzintensitäten wurde auf eine OD_{580nm} von 1 normiert (Abb. 7.10 im Anhang). Die Messungen wurden in biologischen und technischen Triplikaten durchgeführt.

Mit dem YFP-Detektor konnte auch für die intrazelluläre *in vivo* Detektion über den gesamten Messbereich eine starke Korrelation zwischen hydrolytischer Aktivität und Fluoreszenzintensität beobachtet werden ($r=0,96$; $R^2=0,93$). Auch bei der Verwendung des CFP-Detektors konnte eine Korrelation zwischen CFP-Fluoreszenzintensität und enzymatischer Aktivität der GUS11 festgestellt werden ($r=0,76$; $R^2=0,59$). Jedoch war zusätzlich eine verringerte Nachweisempfindlichkeit bei GUS11-Varianten, die eine geringere Proteinmenge produzierten, messbar, sodass diese Varianten nicht mehr eindeutig von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden konnten (LV: $370,44 \pm 9,25$ AU; 4nt-GUS11: $379,00 \pm 17,29$ AU aus Abb. 7.10B im Anhang). Da auch mit der CFP-Detektorvariante noch eine starke Korrelation zwischen über die Aktivität bestimmter GUS11-Menge und Fluoreszenzintensität erreicht werden konnte, sollte überprüft werden, ob der intrazelluläre *in vivo* Nachweis auch mit einer P4-Detektorvariante möglich ist. Bei P4 handelt es sich um ein Fluoreszenzprotein, welches noch weiter blauverschoben ist als CFP (Heim et al., 1994, Heim et al., 1996).

Dafür wurde die Punktmutation Y66H (Heim et al., 1996) in das Plasmid pHT01-iSplitGFP mittels QuikChange®-PCR (Kapitel 2.5.2) mit dem Primerpaar QC-fw-Y66H-P4/QC-rev-Y66H-P4 (Tab.

2.3) für die Konstruktion des Plasmides pHT01-iSplitP4 eingebracht (Tab. 2.2). Anschließend wurde *B. subtilis* mit diesem und einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 mit variierenden RBS-Spacern von 4 bis 11 nt transformiert (Kapitel 2.4.5) und für 24 Stunden unter Standardbedingungen in FlowerPlates® kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Zur Expression von *P4-1-10(TGA11)* wurde zu Kultivierungsbeginn 1 mM IPTG zugesetzt. Im Anschluss wurden die enzymatischen Aktivitäten der GUS11 im Zelllysate mit pNPG gemessen (Kapitel 2.6.5) und die holo-P4-Fluoreszenzen in den lebenden Zellen ausgelesen (Kapitel 2.7.3.1; Abb. 7.10C im Anhang). Zur besseren Übersicht wurde die Korrelation zwischen Aktivität und Fluoreszenz dargestellt (Abb. 3.20C). Für den iSplit P4 Assay zeigte sich mit $r=0,77$ ($R^2=0,59$) eine zu der CFP-Detektorvariante ähnliche Korrelation zwischen Aktivität und Fluoreszenz. Im Unterschied zur CFP-Detektorvariante konnte keine verringerte Nachweisempfindlichkeit im Bereich von geringen GUS11-Mengen beobachtet werden. Erneut ist die abfallende Korrelation der blauverschobenen Detektorvarianten wahrscheinlich ein kombinatorischer Effekt aus den absteigenden Fluoreszenzhelligkeiten und der Eigenfluoreszenz des oLB-Mediums und der *B. subtilis*-Zellen (Heim et al., 1996, Pédelacq et al., 2005, Patterson et al., 2001, Hill et al., 2009).

Nachdem erfolgreich weitere Detektorvarianten für die intra- und extrazelluläre Detektion von Zielproteinen etabliert werden konnten, musste für das Drei-Sensor-System eine Fluoreszenzreporterkombination gefunden werden, welche eine zuverlässige Detektion zusammen mit einer eindeutigen Unterscheidung der drei auszulesenden Signale gewährleistet. Normalerweise können dafür Datenbanken wie die FPbase (Lambert, 2019) genutzt werden wie auch bereits bei der Etablierung der Detektorvarianten (Abb. 3.19; Abb. 3.20). Da es für die konstruierten Detektorproteine, welche auf sfGFP basieren, keine Eintragungen in einer Datenbank gab, sollten diese jedoch für die eindeutige Unterscheidung der Messsignale in einem kombinierten System charakterisiert werden. Dafür wurden die Plasmide pHT01-YFP, pHT01-CFP, pHT01-P4 und pHT01-mCherry konstruiert. Für die Konstruktion der Expressionsplasmide der sfGFP-basierten Varianten durch Aminosäureaustausche im Plasmid pHT01-sfGFP1-11 wurden die in Tab. 3.3 aufgeführten Primerpaare in QuikChange®-PCRs (Kapitel 2.5.2) genutzt.

Tab. 3.3: Bei der QuikChange®-PCR verwendete Primer zur Erzeugung der Expressionsplasmide der sfGFP-Varianten

Plasmid	Verwendete Primer
pHT01-P4	QC-fw-Y66H-P4 / QC-rev-Y66H-P4
pHT01-CFP	QC-fw-Y66W / QC-rev-Y66W
pHT01-YFP	QC-fw-Q69K / QC-rev-Q69K QC-fw-T203Y / QC-rev-T203Y

Für das Plasmid pHT01-mCherry wurde zunächst *mCherry* mit den Primern SLIC-mCherry-pHT01fw und SLIC-mCherry-pHT01rev (Tab. 2.3) vom Plasmid pJOE-sgRNA:htrA-mCherry und das Vektor-Rückgrat vom pHT01 mit den Primern SLIC-pHT01-mCherryfw und SLIC-pHT01-mCherryrev (Tab. 2.3) mittels PCR amplifiziert (Kapitel 2.5.1). Beide Fragmente wurden anschließend mittels SLIC zu pHT01-mCherry ligiert (Kapitel 2.5.10).

Anschließend wurde *B. subtilis* mit den Plasmiden pHT01-GFP, pHT01-CFP, pHT01-P4, pHT01-YFP oder pHT01-mCherry transformiert (Kapitel 2.4.5), bevor die Transformanden für 24 Stunden unter Standardbedingungen in FlowerPlates® kultiviert wurden (Kapitel 2.4.4.3). Zu Beginn der Kultivierung wurden alle Kulturen zur Expression des Fluoreszenzproteins mit 1 mM IPTG supplementiert. Nach der Kultivierung wurde von den Kulturen ein Emissionsspektrum aufgezeichnet, nachdem geeignete Anregungswellenlänge mit Hilfe der FPbase (Lambert, 2019) ausgewählt wurden (Kapitel 2.7.6; Abb. 3.21B). Zum Vergleich wurden noch die in der FPbase hinterlegten Emissionsspektren für die aus der Literatur bekannten Versionen der Proteine P4, CFP, sfGFP, eYFP und mCherry dargestellt (Lambert, 2019; Abb. 3.21A).

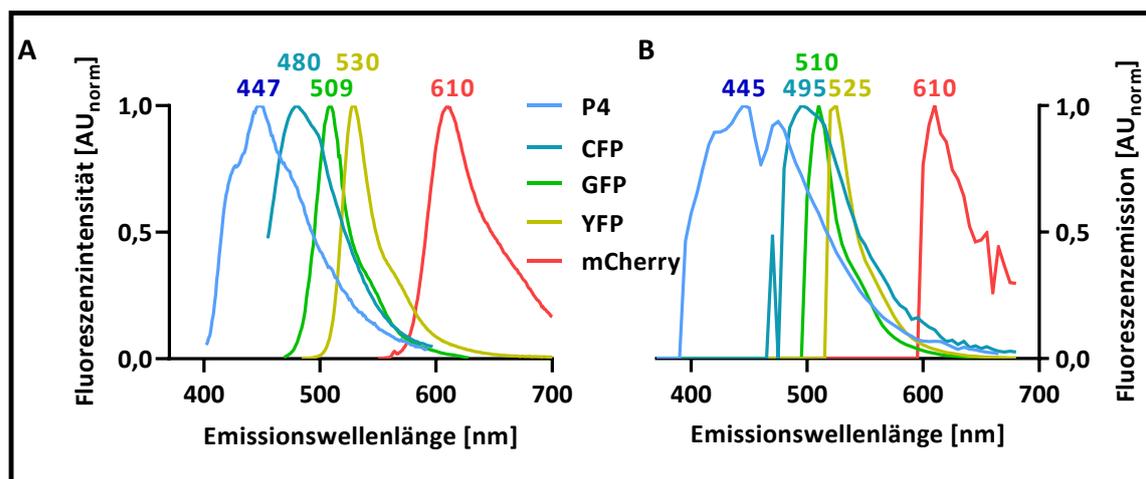


Abb. 3.21: Fluoreszenzemissionsspektren der in dieser Arbeit genutzten Fluoreszenzreporterproteine. Das Emissionsmaximum der jeweiligen Fluoreszenzproteine wurde für eine bessere Sichtbarkeit in den Graphen eingetragen. **A** Referenzemissionsspektren entnommen von FPbase.org (Lambert, 2019). **B** Zur Gewinnung der Emissionsspektren wurde *B. subtilis* mit dem Plasmid pHT01-sfGFP (GFP, grün), pHT01-CFP (CFP, türkis), pHT01-P4 (P4, blau), pHT01-YFP (YFP, gelb) oder pHT01-mCherry (mCherry, rot) transformiert. Die Transformanden wurden für 24 Stunden bei 30°C und 1100 UpM in FlowerPlates® kultiviert. Zur Induktion der Fluoreszenzreportergene wurde zu Kultivierungsbeginn mit 1 mM IPTG supplementiert. Die Emissionsspektren wurden auf die Fluoreszenzintensitätsmaxima normiert.

Die Emissionsspektren von *sfGFP* und *mCherry* stimmten mit denen aus der FPbase (Lambert, 2019) entnommenen Spektren überein. Im Vergleich dazu waren die auf *sfGFP*-basierten konstruierten Reporter in ihrer Emission in den grünen Wellenlängenbereich verschoben. So zeigte die P4-Variante zusätzlich zu dem aus der Literatur bekannten Maximum bei etwa 445 nm ein zweites Maximum bei 470 nm. Dies wird wahrscheinlich eine Kombination aus der geringen Fluoreszenzhelligkeit und den Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von *B. subtilis* in diesem Wellenlängenbereich zurückzuführen sein (Hill et al., 2009). Das Emissionsmaximum der entsprechenden YFP-Variante lag um 5 nm verschoben bei 525 nm anstatt bei 530 nm. Die größte Verschiebung der Emission konnte für die CFP-Variante beobachtet werden, deren Emissionsmaximum von 480 nm auf 495 nm verschoben war.

Für die simultane Nutzung und eindeutige Trennung der Signale der Split FP-basierten Nachweismethoden für intra- und extrazelluläre Proteine musste eine Detektorkombination gewählt werden, deren Emissionsmaxima eindeutig trennbar waren. Da bei der *in vivo* Anwendung des Split GFP Assays bei der Nutzung des GFP-Detektors bereits die Nachweisempfindlichkeit im Bereich von gering sekretierenden Cut11-Varianten verringert war (Abb. 3.17), konnte für diesen Assay auch keine alternative Variante mit schlechterer Fluoreszenzhelligkeit gewählt werden. Aus diesem Grund wurde für die intrazelluläre Detektion der P4-Detektor ausgewählt, da die Emissionsmaxima der CFP- und YFP-Detektorvarianten dem Emissionsmaximum von *sfGFP* zu ähnlich waren. Zur Übersicht wurde in Abb. 3.22 das kombinatorische Dreisensor-System mit den verwendeten Detektorproteinen dargestellt.

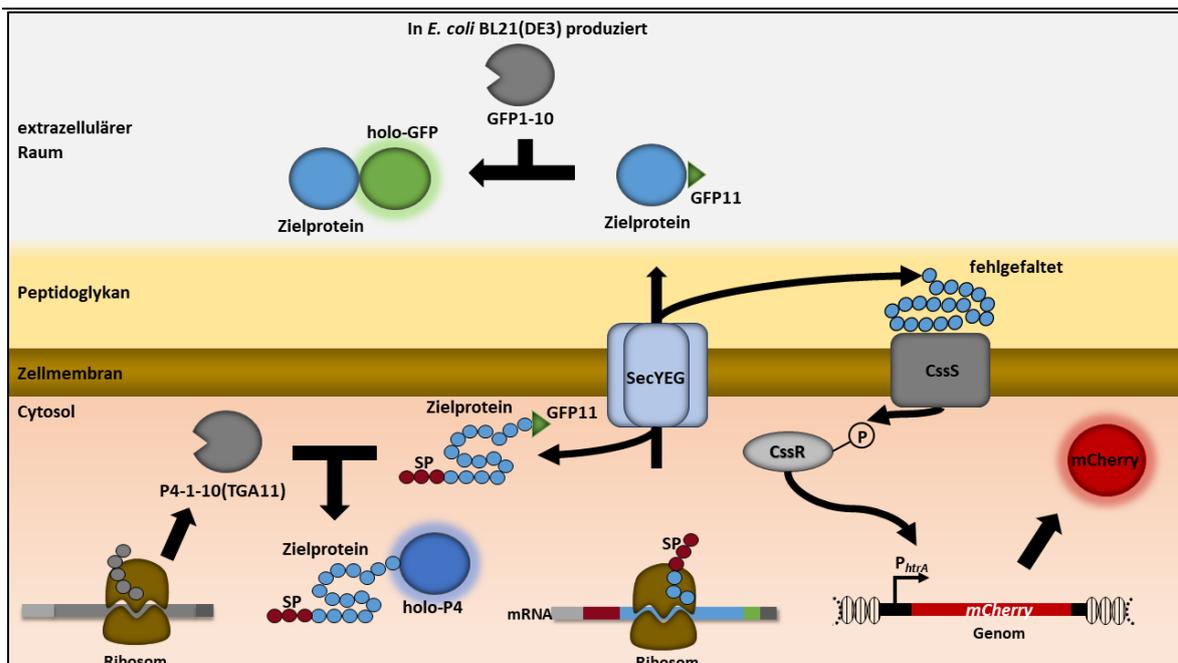


Abb. 3.22: Modell des Drei-Sensor-Systems zur aktivitätsunabhängigen Analyse der Produktion und Sekretion von (rekombinanten) Proteinen in *B. subtilis*. Für die kombinierte Betrachtung wurden die drei in dieser Arbeit etablierten *in vivo* Einzelmethoden kombiniert. Mit dem iSplit P4 Assay kann die Menge an nicht sekretiertem und intrazellulär verbliebenem Zielprotein durch die Koproduktion mit dem Detektor P4-1-10(TGA11) gemessen werden. Durch den Split GFP Assay, bei welchem während der Kultivierung das extern in *E. coli* BL21(DE3) produzierte GFP1-10 der Kultur zugeführt wird, können sekretierte Zielproteine detektiert werden. Zusätzlich kann mit dem Sekretionsstress-Biosensor die Bildung von fehlgefaltetem Protein am Übergang von Zellmembran und Peptidoglykan über das CysRS Zweikomponentensystem nachgewiesen und über die mCherry-Fluoreszenz ausgelesen werden.

3.3.2 Kombinierte Analyse der Cut11-Sekretion

Nachdem neben der Etablierung der drei Nachweissysteme auch die zu verwendenden Detektorvarianten definiert waren, wurde in einem nächsten Schritt überprüft, ob das Drei-Sensor-System für die Analyse der Cut11-Sekretion genutzt werden konnte. Dafür wurde *B. subtilis* PAL5 mit dem Plasmid pHT01-iSplitP4 und mit einem der bereits in Kapitel 3.2.1.2 verwendeten Plasmide pBS-4nt-SP_{Pel}-Cut11, pBS-4nt-SP_{Epr}-Cut11 und pBS-4nt-SP_{Bsn}-Cut11 oder dem pBSMul1 Leervektor transformiert (Kapitel 2.4.5). Die Transformanten wurden anschließend für 24 Stunden unter Standardbedingungen in FlowerPlates® kultiviert (Kapitel 2.4.4.3). Zur Überprüfung etwaiger Einflüsse der verschiedenen Systeme aufeinander wurden vier Kulturansätze angefertigt, wobei jeder Ansatz zu Kultivierungsbeginn mit 1 % (w/v) Glukose supplementiert wurde. Ein Kulturansatz wurde ohne weitere Additive kultiviert und fungierte als Negativkontrolle (Abb. 3.23A). Einem Ansatz für die iSplit P4-Kontrolle wurde zu Kultivierungsbeginn für die P4-1-10(TGA11)-Expression 1 mM IPTG zugegeben (Abb. 3.23B). Dem Ansatz der Split GFP-Kontrolle wurde nach 16-stündiger Kultivierung GFP1-10 zugeführt (Abb. 3.23C) und der Ansatz des kombinierten Systems wurde mit 1 mM IPTG induziert und nach 16-stündiger Kultivierung mit GFP1-10 versetzt (Abb. 3.23D). Nach der Kultivierung

wurden jeweils Proben für die Aktivitätsmessung der sekretierten Cut11 im zellfreien Kulturüberstand (Kapitel 2.6.4) und für die spektrometrische Messung des Drei-Sensor-Systems (Kapitel 2.7.5) entnommen (Abb. 3.23).

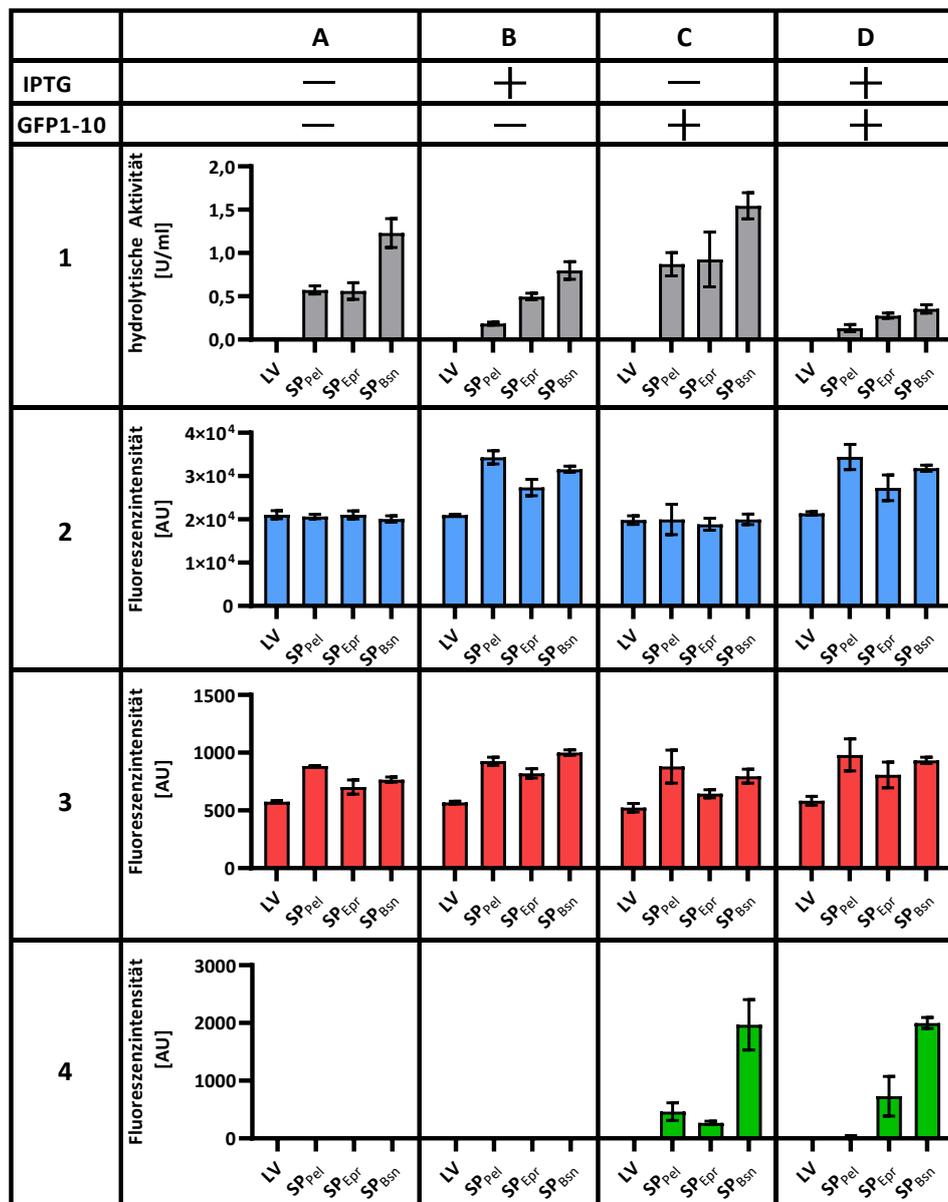


Abb. 3.23: Kombinierte Analyse der Synthese und Sekretion der Cut11. Für die hier dargestellte Analyse wurde *B. subtilis* PAL5 mit dem Detektor-Plasmid pHT01-iSplitP4 und einem der Plasmide pBS-4nt-SP_{Pel}-Cut11, pBS-4nt-SP_{Epr}-Cut11 oder pBS-4nt-SP_{Bsn}-Cut11 bzw. dem pBSMu11 Leervektor (LV) transformiert und anschließend für 24 Stunden in mit 1 % (w/v) Glukose versetztem oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM in FlowerPlates® kultiviert. **A** Negativkontrolle für die Zielproteinquantifizierungsmethoden ohne IPTG und GFP1-10. **B** Kulturen zur Quantifizierung intrazellulärer Cut11 mit 1 mM IPTG induzierter *P4-1-10(TGA11)*-Expression zu Kultivierungsbeginn. **C** Split GFP Kulturen ohne IPTG, zur Quantifizierung sekretierter Cut11 Menge, mit 3 % (v/v) GFP1-10 Zugabe nach 16-stündiger Kultivierung. **D** Kulturen für die kombinierte Analyse der Cut11-Sekretion, denen zu Beginn 1 mM IPTG für die Detektorexpression und nach 16-stündiger Kultivierung 3 % (v/v) GFP1-10 für den Split GFP Assay zugegeben wurde. Bei allen Kulturen wurde nach der Kultivierung die Aktivitäten im Kulturüberstand mit *pNPP* bestimmt (1). Zusätzlich wurde bei allen Kulturen die P4- (2), *sfGFP*- (4) und die *mCherry*-Fluoreszenz (3) ausgelesen. Alle enzymatischen Aktivitäten und gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf eine OD_{580nm} von 1 normiert. Alle Messungen wurden in biologischer und technischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die daraus resultierenden Mittelwerte sind dargestellt. Die Standardabweichungen der biologischen Replikate sind als Fehlerbalken vorhanden.

Durch die alleinige Nutzung des Zweiplasmidsystems ohne GFP1-10 Zugabe oder Induktion der intrazellulären Detektorexpression (Abb. 3.23-A1) war ein zum Einplasmidsystem verändertes Aktivitätsmuster für die drei Signalpeptide messbar. Die Aktivität bei der SP_{Pel} -vermittelten Cut11-Sekretion lag mit $0,57 \pm 0,05$ U/ml auf dem gleichen Niveau wie die der SP_{Epr} -Variante ($0,56 \pm 0,10$ U/ml). Die SP_{Bsn} -Variante zeigte weiterhin die höchste extrazelluläre Aktivität ($1,23 \pm 0,17$ U/ml). Bei der Nutzung des Einplasmidsystems konnte noch ein graduelles Aktivitätsmuster gemessen werden ($SP_{Bsn} > SP_{Pel} > SP_{Epr}$; Abb. 3.12). Mit der Koproduktion des intrazellulären Detektors (Abb. 3.23-B1) war eine weitere Verringerung der extrazellulären Aktivität der SP_{Pel} -Variante auf $0,18 \pm 0,02$ U/ml messbar. Zusätzlich war auch für die SP_{Bsn} -Variante die Aktivität mit $0,80 \pm 0,10$ U/ml verringert, während die extrazelluläre Aktivität bei SP_{Epr} nahezu unverändert blieb ($0,50 \pm 0,04$ U/ml), wodurch sich das graduelle Aktivitätsmuster $SP_{Bsn} > SP_{Epr} > SP_{Pel}$ ergab. Die extrazellulären Aktivitäten der Split GFP-Kontrolle (Abb. 3.23-C1) ähnelten denen der Negativkontrolle (Abb. 3.23-A1). Bei der Aktivitätsmessung des kombinierten Drei-Sensor-Systems (Abb. 3.23-D1) waren die Aktivitäten im Vergleich zur Detektorkoproduktionskontrolle (Abb. 3.23-B1) nochmal verringert, zeigten aber das gleiche graduelle Aktivitätsmuster ($SP_{Bsn} > SP_{Epr} > SP_{Pel}$). Bei beiden Kontrollen, denen kein IPTG für die Detektorkoproduktion zugeführt wurde (Abb. 3.23-A2+C2), konnten keine Signale für intrazellulär verbliebene Cut11 detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass die basale Expression des P_{grac} Promotors (Kapitel 3.1.5) nicht für die Detektion von aufgrund einer unvollständigen Sekretion im Cytosol verbliebenen Proteinen ausreicht. Bei der Koproduktion des P4-Detektors mit der Cut11 (Abb. 3.23-B2) konnten signalpeptidabhängige, variierende Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten gemessen werden, wobei die SP_{Pel} -Variante mit $3,4 \times 10^4 \pm 0,16 \times 10^4$ AU das stärkste und die SP_{Epr} -Variante mit $2,7 \times 10^4 \pm 0,19 \times 10^4$ AU das schwächste holo-P4-Signal zeigte. Durch die signalpeptidabhängigen Unterschiede in der Fluoreszenzintensität kann davon ausgegangen werden, dass durch einen iSplit FP-basierten Nachweis intrazellulär verbliebenes eigentlich sekretiertes Zielprotein nachgewiesen werden kann. Das kombinierte Drei-Sensor-System (Abb. 3.23-D2) zeigte ähnliche holo-P4-Fluoreszenzintensitäten wie die Kontrolle (Abb. 3.23-B2). Unter allen in diesem Experiment durchgeführten Kultivierungsbedingungen konnten ähnliche Sekretionsstress-Sensorsignale detektiert werden (Abb. 3.23-3), wobei das Signal der SP_{Pel} -Variante, welches im Einplasmidsystem im Vergleich zu den beiden anderen Signalpeptiden um 1/3 erhöht war (Abb. 3.12), bei der Nutzung des Zweiplasmidsystems nur noch minimal stärker war (SP_{Pel} : $883,49 \pm 4,81$ AU; SP_{Bsn} : $766,91 \pm 21,40$ AU in Abb. 3.23-A3). Wie erwartet, konnten ohne GFP1-10 Zugabe keine Split GFP-Signale detektiert werden (Abb. 3.23-A4+B4). Bei der Split GFP-

Kontrolle (Abb. 3.23-C4) konnten holo-GFP-Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Diese korrelierten mit den dazugehörigen Aktivitäten im Überstand (Abb. 3.23-C1) und zeigten mit $SP_{Bsn} > SP_{Pel} = SP_{Epr}$ ein ähnliches Fluoreszenzmuster. Auch mit dem Drei-Sensor-System (Abb. 3.23-D4) waren holo-GFP-Fluoreszenzintensitäten messbar, die mit der dazugehörigen extrazellulären Aktivität der Cut11 korrelierten. Einzig für die SP_{Pel} -Variante konnte kein holo-GFP-Signal detektiert werden. Da bei dieser Variante auch eine geringe Aktivität messbar war (Abb. 3.23-D1), ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass der *in vivo* Split GFP Assay für die Auflösung dieser Variante nicht sensitiv genug ist. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Nutzung des Drei-Sensor-Systems für die umfassende Analyse der Cut11-Sekretion hinsichtlich Sekretionsstress, intra- und extrazellulärer Cut11 möglich war. So war es auch im Drei-Sensor-System möglich signalpeptidabhängige Sekretionsstress-Biosensorsignale auszulesen (Abb. 3.23-3), auch korrelierten weiterhin extrazelluläre Aktivität und Split GFP-Signal (Abb. 3.23-D1+D4), wobei die Nachweisgrenzen des Systems an der SP_{Pel} -Variante aufgezeigt wurden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass mit einem iSplit FP-basierten Nachweis die Menge an intrazellulär verbliebenem sekretorischem Protein nachgewiesen werden kann (Abb. 3.23-B2+D2).

Neben der reinen Etablierung des Drei-Sensor-Systems konnten die gemessenen Signale auch für die umfassende Analyse der Produktion und Sekretion der Cut11 genutzt werden. Die SP_{Pel} -Variante zeigte im Vergleich zu den beiden anderen Signalpeptidvarianten bei der Verwendung des Zweiplasmidsystems eine deutliche Verringerung der extrazellulären Aktivität und des Sekretionsstress-Biosensorsignals im Vergleich zum Einplasmidsystem (Vgl. Abb. 3.23-A1+A3 mit Kapitel 3.2.1), was in Kombination auf eine allgemein verringerte Proteinbiosynthese hindeutet. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Resistenzausbildung welche unabdingbar für das zelluläre Überleben ist dazu führt, dass weniger Ribosomen aus dem cytosolischen Pool für die Translation der Cut11-Varianten zur Verfügung stehen (Raveh et al., 2016), was den größten Einfluss auf die SP_{Pel} -Variante hat, da diese mit einer zehnfach höheren TIR als die Varianten SP_{Epr} und SP_{Bsn} eine deutlich effizientere Translation aufweist (Volkenborn et al., 2020). Trotz der scheinbar verringerten Proteinbiosynthese zeigte die SP_{Pel} -Variante das höchste Signal für intrazellulär akkumulierte Cut11 im Vergleich zu den Varianten SP_{Epr} und SP_{Bsn} ($SP_{Pel} > SP_{Bsn} > SP_{Epr}$; Abb. 3.23-B3+D3). Große Mengen an intrazellulär akkumuliertem eigentlich zu sekretierendem Protein deuten auf eine Überladung der Sekretionsmaschinerie durch eine zu effiziente Translation im Vergleich zum Sekretionsprozess hin, wie es bereits in *E. coli* gezeigt wurde (Feilmeier et al., 2000, Mergulhao et al., 2004). Die Überladung der Sekretionsmaschinerie kann sich beim Vergleich von verschiedenen Signalpeptiden zusätzlich

zum Einfluss der Translationseffizienz aus weiteren Faktoren wie der Erkennung des Signalpeptides durch das SRP und der Codonverwendung und der damit einhergehenden Translationsgeschwindigkeit zusammensetzen. Für die Erkennung durch das SRP ist die Aminosäuresequenz des Signalpeptides verantwortlich (Peterson et al., 2003, Lee et al., 2001, Natale et al., 2008), wohingegen die Translationsgeschwindigkeit das mögliche Zeitfenster für die Bindung definiert (Zalucki et al., 2007, Zalucki et al., 2009, Pechmann et al., 2014). Bei der kotranslationalen Sekretion wird das Signalpeptid bereits beim Austritt aus dem Ribosomentunnel vom SRP erkannt und gebunden (Luirink et al., 2005). Durch diese Bindung wird zum einen die Translation verlangsamt und zum anderen die Polypeptidkette an der Faltung gehindert (Lakkaraju et al., 2008, Freudl, 2018). Der Ribosomen-Polypeptid-SRP-Komplex wird dann über mehrere Schritte zum Translokon geführt, wo anschließend, das Protein in die Translokationspore translatiert und damit gleichzeitig sekretiert wird (Freudl, 2018, Elvekrog et al., 2015). Bei dieser Form der Sekretion ist der GFP11-*tag* somit wahrscheinlich zu keiner Zeit im Cytosol exponiert. Eine holo-Fluoreszenzreporter Rekonstitution wäre nur möglich, wenn das SRP das Signalpeptid nicht effizient genug erkennt bzw. das Peptid für die Erkennung zu schnell translatiert wird und das Protein bzw. der GFP11-*tag* dadurch im Cytoplasma exponiert wäre. Die Translokation durch den Sec-Apparat ist dann nicht mehr möglich (Harwood et al., 2008) und mit der Nutzung des intrazellulären Sensors könnten diese Moleküle über die Fluoreszenz ausgelesen werden, wie es hier zu beobachten war (Abb. 3.23B+D). Es gibt Hinweise, dass die Abnahmen der extrazellulären Aktivitäten bei der Detektorkoproduktion (Abb. 3.23-B1+D1), von welcher vor allem die SP_{Pel}-Variante betroffen war (Verringerung: SP_{Pel}: etwa 66 %; SP_{Bsn}: etwa 15 %; SP_{Epr}: etwa 10 %) nicht nur durch eine verringerte Proteinbiosynthese aufgrund der Koproduktion zustande kam. So waren bei Kultivierungen mit und ohne Koproduktion des P4-Detektors die gleichen Signalintensitäten des Sekretionsstress-Biosensors messbar (Abb. 3.23-3). Zusätzlich konnten bei der extrazellulären Detektion mittels Split GFP Assay für die Varianten SP_{Bsn} und SP_{Epr} ähnlich starke Signalintensitäten gemessen werden (SP_{Epr}: 270,32 ± 29,59 AU zu 729,75 ± 343,18 AU; SP_{Bsn}: 1968,15 ± 434,55 AU zu 1998,40 ± 95,64 AU; Abb. 3.23-C4+D4), was zusammen dafürspricht, dass trotz unterschiedlich messbarer Aktivitäten in Abb. 3.23-C1+D1 bei den Varianten SP_{Bsn} und SP_{Epr} eine ähnliche Menge an Cut11 sekretiert wurde. Bei der Etablierung des intrazellulären Sensors konnte gezeigt werden, dass dieser vor allem bei Varianten mit vermehrter intrazellulärer Fluoreszenz zu (leicht) erhöhter Zelllyse führt (Kapitel 3.1.6). *B. subtilis* hat ein sehr ausgeprägtes intrazelluläres Proteolysenetzwerk (Harwood et al., 2021) und mit (leicht) erhöhter Zelllyse bei der Nutzung des intrazellulären Sensors, könnten sich

intrazelluläre Proteasen über die Dauer der Kultivierung im Überstand anreichern und die Cut11 vor der Aktivitätsmessung degradieren. Ähnliches wurde bereits bei intrazellulärer Cut11 beim iSplit FP-basierten Nachweis beobachtet. Trotz messbarer Fluoreszenzintensitäten konnte am Ende der Kultivierung keine enzymatische Aktivität im Zellysate nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das dennoch Signal im extrazellulären Raum für die Cut11 detektiert werden konnte, liegt vermutlich daran, dass entweder der GFP11-*tag* der Cut11 nicht degradiert wurde oder, dass die Cutinasedegradation erst nach der holo-GFP Rekonstitution stattfindet und das holo-GFP proteolyseresistent ist. Auch wenn die Fusion von Fluoreszenzreportern mit Zielproteinen in der Literatur oft für einfach auszulesende Degradationsanalysen genutzt wird (Trauth et al., 2020), konnte vor allem für *sfGFP*-Fusionen gezeigt werden, auf dem die hier genutzten Detektorvarianten basieren, dass dieser Reporter trotz Degradation des Fusionspartners nicht degradiert wurde (Reichard et al., 2016, Khmelinskii et al., 2016). Einzig die SP_{pel}-Variante konnte beim kombinierten Sensorsystem nur noch über die enzymatische Aktivität (Abb. 3.23-D1) aber nicht mehr über den extrazellulären Sensor nachgewiesen werden (Abb. 3.23-D4). Dies spricht dafür, dass bei dieser Variante neben dem potenziellen Degradationsproblem auch tatsächlich weniger korrekt gefaltete Cut11 in den extrazellulären Raum sekretiert wird und diese Menge unter der Nachweisgrenze des extrazellulären Sensors liegt. Abschließend konnte bei der hier durchgeführten Analyse gezeigt werden, dass es trotz ähnlicher Cut11-Signale im extrazellulären Raum Unterschiede bei den intrazellulären Cut11-Leveln und den Sekretionsstress-Antworten gab, womit aufgezeigt werden konnte, dass SP_{pel} mit den stärksten intrazellulären und Stress-Signalen eine verringerte Sekretionseffizienz im Vergleich zu den beiden anderen Signalpeptiden aufweist, was ohne das Drei-Sensor-System nicht ersichtlich war.

Zusätzlich zu der Möglichkeit mit dem Split FP-basierten intrazellulären Detektionssystem die Überladung der Sekretionsmaschinerie auszulesen, könnte dieser Sensor dabei helfen festzustellen, ob ein Signalpeptid die ko- oder die posttranslationale Sekretion vermittelt. Dies geschah bisher entweder indirekt über die Verwendung von Deletionsmutanten und anschließender Analyse des Sekretoms oder direkt über *cross-linking* Experimente zwischen Signalpeptid und Interaktionspartner wie etwa dem SRP (Hirose et al., 2000, Valent et al., 1997). Bei der posttranslationalen Sekretion wird das Zielprotein bereits vollständig translatiert und anschließend von einem, in *B. subtilis* noch nicht näher definierten, Chaperon in seiner ungefalteten Form fixiert und für die Sekretion zur Translokationspore befördert (Tjalsma et al., 2000, Kawaguchi et al., 2001, Vitikainen et al., 2005, Park et al., 2015, Müller et al., 1992, Freudl, 2018). Da bei dieser Sekretionsform der GFP11-*tag* im Cytosol exponiert vorliegt,

könnte der koproduzierte Detektor mit diesem vor der Sekretion assemblieren und das Fluoreszenzsignal ausgelesen werden. Das entstandene holo-Fluoreszenzprotein könnte dann nicht mehr über den Sec-Apparat sekretiert werden, da dieser nur ungefaltete Proteine sekretieren kann (Harwood et al., 2008). So würde die Nutzung des iSplit P4 Assays die Sekretion von posttranslational sekretierten Proteinen deutlich verringern oder sogar unmöglich machen. Diese Anwendungsweise wäre eine deutliche Vereinfachung zu den bisher durchgeführten, komplexen und auch zeitaufwändigen Methoden für die Identifikation des signalpeptidvermittelten Sekretionsweges, müsste aber noch am Beispiel eines posttranslational sekretierten (rekombinanten) Proteins überprüft werden.

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, lassen sich zusätzlich zu den durch den iSplit P4 Assay messbaren Informationen über den Sekretionsstress-Biosensor noch Aussagen über die Faltung tätigen, die mit Hilfe von Chaperonen wie PsaA oder aber auch autokatalytisch mit Hilfe von Kationen im Peptidoglykan abläuft (Kontinen et al., 1991, Harwood et al., 2008, Kouwen et al., 2007). Durch die Nutzung des Drei-Sensor-Systems als Analysemethode für die Sekretion gibt der Sekretionsstress nicht nur Aufschluss über ein mögliches Optimierungspotential bei der Anwendung von Hochdurchsatzoptimierungen, wie in Kapitel 3.2 diskutiert, sondern kann vielmehr als Stellschraube für gezielte auf das analysierte Protein bzw. die analysierte Fusion von Signalpeptid und Protein abgestimmte Optimierungsmethoden genutzt werden. So könnte bei Varianten mit hohem Sekretionsstress etwa das Chaperon PrsA überexprimiert oder sogar das Zielprotein auf effizientere Faltung hin modifiziert werden (Quesada-Ganuza et al., 2019, Yang et al., 2019).

Und mit dem Split GFP Assay, dessen Vorteile bereits in Kapitel 3.2 diskutiert wurden, kann am Ende aktivitätsunabhängig die Menge an Protein detektiert werden, die sich im extrazellulären Raum befindet. Selbst wenn das System nicht für die Analyse von Varianten für gezielte Optimierungsschritte genutzt werden sollte, hat es immer noch Vorteile in großen Screening-Kampagnen wie den Signalpeptid-Screening genutzt zu werden. So kann durch die Kombination aller drei Systeme im Hochdurchsatz eine Art Sekretionseffizienz bestimmt werden, die Aussagen darüber zulässt wie effizient das Zielprotein produziert und sekretiert wird. Um ähnliche Aussagen über eine Sekretionseffizienz machen zu können, müssen bisher deutlich umfangreichere und schwieriger durchzuführende Methoden wie die Pulsmarkierung genutzt werden (Bolhuis et al., 1999b, Neef et al., 2020).

Abschließend konnte in dieser Arbeit somit ein kombiniertes Nachweissystem für die Analyse der rekombinanten Produktion und Sekretion von Proteinen in *B. subtilis* erfolgreich entwickelt und am Beispiel der Cutinase auch genutzt werden. Die einzelnen Systeme sind durch die

Nutzung verschiedener Fluoreszenzreporter flexibel variierbar und können auch als eigenständige Methoden genutzt werden. Durch seine Aktivitätsunabhängigkeit ist das Drei-Sensor-System für nahezu jedes Zielprotein einsetzbar und bietet einen bislang in dieser Tiefe nicht möglichen simplen *in vivo* Einblick in den Prozess der Proteinsekretion in *B. subtilis*.

Zusammenfassung

Ein kombiniertes Nachweissystem für die rekombinante Produktion und Sekretion von Proteinen

- Das Anwendungsspektrum der beiden Split GFP-basierten Nachweismethoden für intra- und extrazelluläre Proteine konnte durch die Konstruktion neuer Detektoren erweitert werden.
- Mit der Untersuchung der Fluoreszenzemissionsspektren der in dieser Arbeit genutzten GFP-Derivate konnte eine geeignete Fluoreszenzproteinkombination für das Drei-Sensor-System gefunden werden. Für die Detektion des sekretierten Zielproteins wurde *sfGFP* gewählt und für die Messung der intrazellulären Menge an nicht sekretiertem Zielprotein wurde der P4-basierte Detektor gewählt, welcher mit dem Emissionsmaximum bei $\lambda = 450$ nm deutlich von dem Emissionsmaximum von *sfGFP* ($\lambda = 510$ nm) unterscheidbar war.
- Der iSplit P4 Assay, der mCherry-basierte Sekretionsstress-Biosensor und der *in vivo* Split GFP Assay konnten zu einem Drei-Sensor-Nachweissystem für Produktion und Sekretion von Proteinen kombiniert werden.
- Bei der Verwendung des Drei-Sensor-Systems waren trotz konstanter Split GFP-Signale Aktivitätseinbußen messbar, welche durch eine mögliche Degradation der Cutinase durch Anreicherung intrazellulärer Proteasen durch erhöhte Zellyse erklärbar waren.
- Durch das Drei-Sensor-System konnten die Sekretionseffizienzen der Cut11-Sekretion mit den Signalpeptiden SP_{Pel} , SP_{Epr} und SP_{Bsn} analysiert werden, wobei sich zeigte, dass SP_{Pel} die geringste Sekretionseffizienz aufweist.

4 Zusammenfassung

Das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* ist ein gut etablierter Wirt, der in biotechnologischen Produktionsprozessen für die Synthese und Sekretion von rekombinanten Proteinen eingesetzt wird. Um dem stetig wachsenden Bedarf an mikrobiellen Proteinen gerecht zu werden, müssen diese immer effizienter produziert werden. Dies kann durch Optimierungskampagnen wie etwa dem Signalpeptid-Screening im Falle der Sekretionsoptimierung erreicht werden. Da bei solchen Kampagnen zahlreiche Varianten getestet werden, sollte das Zielprotein über ein sogenanntes Hochdurchsatz-Screening einfach nachweisbar und quantifizierbar sein. Dies erfolgt häufig aktivitätsbasiert über die enzymatische Bildung von photo- oder fluorometrisch detektierbaren Produkten. Da nicht für alle Zielproteine solche Aktivitätsassays zur Verfügung stehen, werden immer öfter aufgrund der simplen Auslesbarkeit fluoreszenzbasierte *in vivo* Nachweismethoden genutzt, bei denen die Produktion eines Fluoreszenzreporters an die Zielproteinsynthese gekoppelt wird. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein aktivitätsunabhängiges, fluoreszenzbasiertes System entwickelt, das Split GFP-basiert die Detektion von intra- und extrazellulären Zielproteinen und die Messung von Sekretionsstress über einen transkriptionsfaktorbasierten Biosensor ermöglicht.

Für den Split GFP Assay wird das elfte β -Faltblatt von GFP (GFP11-Tag) an ein Zielprotein fusioniert, welches ein verkürztes, nicht fluoreszierendes GFP (GFP1-10, auch als Detektor bezeichnet) zu fluoreszierendem holo-GFP ergänzen kann. Zu Beginn konnte im Rahmen der Arbeit am Beispiel der β -Glukuronidase aus *Escherichia coli* (GUS11) gezeigt werden, dass der Split GFP Assay für die *in vitro* Detektion intrazellulärer Zielproteine grundsätzlich einsetzbar ist. Um eine *in vivo*-Detektion intrazellulärer Zielproteine zu ermöglichen, wurde anschließend der Detektor optimiert. Durch die Koexpression des modifizierten Detektors und GUS11 konnte anschließend gezeigt werden, dass dieser Split GFP-basierte Sensor für die *online* Überwachung intrazellulärer Zielproteine während der Kultivierung von *B. subtilis* eingesetzt werden kann. Zusätzlich konnte mit diesem Split GFP Assay die Heterogenität der GUS11-Produktion innerhalb der *B. subtilis* Population auf Einzelzellebene analysiert werden. Basierend auf dem Split GFP-Sensorsystem konnte zudem ein *in vivo* Verfahren zur einfachen Detektion sekretierter Zielproteine am Beispiel der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* (Cut11) erfolgreich etabliert werden. Bei diesem Split GFP-basierten Nachweis bleibt der durch die Sekretion des Zielproteins entstehende zelluläre Stress jedoch unberücksichtigt. Daher wurden anschließend auf Grundlage des CsxRS Zweikomponentensystem transkriptionsfaktorabhängige Sekretionsstress-Biosensoren mit *sfGFP* bzw. *mCherry* als Fluoreszenzreporter etabliert.

Mithilfe dieser Biosensoren konnte beobachtet werden, dass die zelluläre Stressantwort nicht mit der sekretierten und aktiven Zielproteinmenge im extrazellulären Raum korreliert. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurde anschließend der mCherry-Stresssensor mit dem Split GFP-basierten Sekretionssensor kombiniert. Mit dieser Kombination war es erstmals möglich, aktivitätsunabhängig und im Hochdurchsatz die Sekretion der Cut11 durch eine Translationsinitiationsoptimierung und ein Signalpeptid-Screening zu optimieren. Interessanterweise konnten so Varianten identifiziert werden, die zu einer verbesserten Sekretion bei gleichzeitig geringem Stresslevel führten. Um die entwickelten Biosensoren zu einem Drei-Sensor-Nachweissystem miteinander kombinieren zu können, wurden anschließend Detektorvarianten mit veränderten Fluoreszenzfarben entwickelt. Durch die veränderten Emissionswellenlängen konnte der blau fluoreszierende P4-Detektor für die intrazelluläre und der grün fluoreszierende GFP-Detektor für die extrazelluläre Detektion eingesetzt und mit dem roten mCherry-Sekretionsstressbiosensor kombiniert werden. Mit diesem kombinierten System konnte die Cut11-Sekretion in Abhängigkeit der Signalpeptide SP_{Pel} , SP_{Epr} und SP_{Bsn} , umfassend analysiert werden. Es zeigte sich, dass trotz ähnlicher extrazellulärer Cut11-Aktivitäten unterschiedliche intrazelluläre Cut11-Level und Sekretionsstress-Antworten messbar waren. In diesem Kontext führte SP_{Pel} -Cut11 zu den stärksten intrazellulären und Stress-Signalen, was auf eine sehr geringe Sekretionseffizienz hindeutet.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit drei fluoreszenzbasierte *in vivo* Nachweissysteme für die Produktion und Sekretion von Proteinen in dem industriell relevanten Organismus *B. subtilis* entwickelt und anschließend auch kombiniert werden. Das dabei entstandene Drei-Sensor-System ermöglichte erstmalig eine umfassende, *in vivo* anwendbare und Zielprotein-unabhängige Analyse der (rekombinanten) Sekretion und ihrer Effizienz, was die Durchführung von zukünftigen Optimierungskampagnen für neue Zielproteine deutlich vereinfachen könnte.

5 Summary

The Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* is a well-established host used in biotechnological production processes for the synthesis and secretion of recombinant proteins. To meet the growing demand for microbial proteins, they must be produced more efficiently. This can be achieved by optimization campaigns such as signal peptide screenings in the case of secretion optimization. Since numerous variants are tested in such campaigns, the target protein should be easily detectable and quantifiable with so-called high-throughput screenings. This is often done activity-based by the enzymatic formation of photo- or fluorometrically detectable products. Since such activity assays are not available for all target proteins, fluorescence-based *in vivo* detection methods, in which the production of a fluorescent reporter is coupled to the target protein synthesis, are increasingly used due to their simple read out. Therefore, in the present work, an activity-independent system was developed that allows split GFP-based detection of intracellular and extracellular target proteins and measurement of secretion stress with a transcription factor-based biosensor.

For the split GFP assay, the eleventh β -sheet of GFP (GFP11 tag) is fused to a target protein. This tag can complement a truncated, non-fluorescent GFP (GFP1-10 also designated as detector) to fluorescent holo-GFP. In this work, using the β -glucuronidase from *Escherichia coli* (GUS11) as a model enzyme, it could first be demonstrated that the split GFP assay can in principle be used for the *in vitro* detection of intracellular target proteins. To enable *in vivo* detection of target proteins, the detector was further optimized. Co-expression of the modified detector and GUS11 demonstrated that this split GFP-based sensor can be used for online monitoring of intracellular target proteins during cultivation of *B. subtilis*. Furthermore, this split GFP assay allowed the analysis of heterogeneity of GUS11 production within the *B. subtilis* population at the single-cell level. Based on the split GFP sensor system, an *in vivo* method for simple detection of secreted target proteins was also successfully established using cutinase from *Fusarium solani pisi* (Cut11) as an example. However, this split GFP-based detection does not take into account the cellular stress resulting from the secretion of the target protein. Therefore, transcription factor-dependent secretion stress biosensors were established based on the CssRS two-component system using *sfGFP* and mCherry as fluorescence reporters, respectively. Using these biosensors, it was observed that the cellular stress response did not correlate with the secreted and active target protein levels in the extracellular space. To further investigate this phenomenon, the mCherry stress sensor was combined with the split GFP-based secretion sensor. With this combination, it was possible for the first time to optimize Cut11 secretion in an activity-independent, high-throughput manner using translation

initiation optimization and signal peptide screening. Interestingly, this allowed the identification of variants that led to improved secretion while maintaining low stress levels. To combine the developed biosensors into a three-sensor detection system, subsequent detector variants with altered fluorescence colors were developed. The altered emission wavelengths allowed the combination of the blue fluorescent P4 detector for intracellular detection and the green fluorescent GFP detector for extracellular detection with the red mCherry secretion stress biosensor. The application of this combined system allowed the detailed analysis of Cut11 secretion mediated with the signal peptides SP_{Pel} , SP_{Epr} , and SP_{Bsn} . It was found that despite similar extracellular Cut11 activities, different intracellular Cut11 levels and secretion stress responses were measurable. In this context, SP_{Pel} -Cut11 resulted in the strongest intracellular and stress signals, indicating very low secretion efficiency.

In summary, in this work, three fluorescence-based *in vivo* detection systems for protein production and secretion in the industrially relevant organism *B. subtilis* were developed and subsequently combined. The resulting three-sensor system allowed for the first time a comprehensive, *in vivo* applicable and target protein-independent analysis of (recombinant) secretion and its efficiency, which will significantly simplify the implementation of future optimization campaigns for new target proteins.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abdelraheem, E. M., Busch, H., Hanefeld, U. & Tonin, F., (2019).** Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production. *Reaction Chemistry & Engineering*, 4, 1878-1894.
2. **Adrio, J. L. & Demain, A. L., (2014).** Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
3. **Aich, S., Delbaere, L. T. & Chen, R., (2001).** Continuous spectrophotometric assay for β -glucuronidase. *BioTechniques*, 30(4), 846-850.
4. **Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S.-I. & Mizushima, S., (1990).** SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(14), 8164-8169.
5. **Akopian, D., Shen, K., Zhang, X. & Shan, S.-O., (2013).** Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 693-721.
6. **Alami, M., Lüke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J. & Müller, M., (2003).** Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 12(4), 937-946.
7. **Altenbuchner, J., (2016).** Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5421-5427.
8. **Amann, T., Hansen, A. H., Kol, S., Hansen, H. G., Arnsdorf, J., Nallapareddy, S., Voldborg, B., Lee, G. M., Andersen, M. R. & Kildegaard, H. F., (2019).** Glyco-engineered CHO cell lines producing alpha-1-antitrypsin and C1 esterase inhibitor with fully humanized N-glycosylation profiles. *Metabolic Engineering*, 52, 143-152.
9. **Ambriz-Aviña, V., Contreras-Garduño, J. A. & Pedraza-Reyes, M., (2014).** Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. *BioMed Research International*, 2014, 461941.
10. **Anagnostopoulos, C. & Spizizen, J., (1961).** Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 81(5), 741.
11. **Åqvist, J. & Kamerlin, S. C., (2015).** Exceptionally large entropy contributions enable the high rates of GTP hydrolysis on the ribosome. *Scientific Reports*, 5(1), 1-9.
12. **Arnaud, M., Chastanet, A. & Débarbouillé, M., (2004).** New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6887-6891.
13. **Ashok, C., Palanimuthu, D., Selvadurai, S. & Varshini, R., (2021).** An apodictic review on recent approaches in enzyme technology. *Biointerface Research Applied Chemistry*, 12, 3446-3471.
14. **Avcilar-Kucukgoze, I. & Kashina, A., (2020).** Hijacking tRNAs from translation: regulatory functions of tRNAs in mammalian cell physiology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 610617.

15. **Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M., (1944).** Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of Experimental Medicine*, 79(2), 137-158.
16. **Bååth, J. A., Borch, K., Jensen, K., Brask, J. & Westh, P., (2021).** Comparative biochemistry of four polyester (PET) hydrolases. *ChemBioChem*, 22(9), 1627-1637.
17. **Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. & Helmann, J. D., (2002).** Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Molecular Microbiology*, 45(6), 1613-1629.
18. **Bakkes, P. J., Lenz, P., Müller, C., Bida, A., Dohmen-Olma, D., Knapp, A., Oldiges, M., Jaeger, K. E. & Freudl, R., (2021).** Biosensor-based optimization of cutinase secretion by *Corynebacterium glutamicum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750150.
19. **Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I. & Médigue, C., (2009).** From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology*, 155(6), 1758.
20. **Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P., (2007).** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5891), 1709-1712.
21. **Bechhofer, D. H., Oussenko, I. A., Deikus, G., Yao, S., Mathy, N. & Condon, C., (2008).** Analysis of mRNA decay in *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*, 447, 259-276.
22. **Bechtluft, P., Nouwen, N., Tans, S. J. & Driessen, A. J., (2010).** SecB — a chaperone dedicated to protein translocation. *Molecular BioSystems*, 6(4), 620-627.
23. **Berks, B. C., (1996).** A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Molecular Microbiology*, 22(3), 393-404.
24. **Bhavsar, A. P., Zhao, X. & Brown, E. D., (2001).** Development and characterization of a xylose-dependent system for expression of cloned genes in *Bacillus subtilis*: conditional complementation of a teichoic acid mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 403-410.
25. **Binder, S., Schendzielorz, G., Stähler, N., Krumbach, K., Hoffmann, K., Bott, M. & Eggeling, L., (2012).** A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. *Genome Biology*, 13(5), R40.
26. **Bisswanger, H., (2014).** Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55.
27. **Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K. & Mayhew, G. F., (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-1462.
28. **Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R. & Sprenger, G. A., (2003).** Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2811-2819.

29. **Blin, K., Pedersen, L. E., Weber, T. & Lee, S. Y., (2016).** CRISPy-web: An online resource to design sgRNAs for CRISPR applications. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(2), 118-121.
30. **Bolhuis, A., Matzen, A., Hyyryläinen, H.-L., Kontinen, V. P., Meima, R., Chapuis, J., Venema, G., Bron, S., Freudl, R. & Van Dijl, J. M., (1999a).** Signal peptide peptidase- and ClpP-like proteins of *Bacillus subtilis* required for efficient translocation and processing of secretory proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24585-24592.
31. **Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H. E., De Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S. & Van Dijl, J. M., (1999b).** Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2934-2941.
32. **Breitling, R., Sorokin, A. V. & Behnke, D., (1990).** Temperature-inducible gene expression in *Bacillus subtilis* mediated by the *c1857*-encoded repressor of bacteriophage lambda. *Gene*, 93(1), 35-40.
33. **Brennan, C. A., Dombroski, A. J. & Platt, T., (1987).** Transcription termination factor rho is an RNA-DNA helicase. *Cell*, 48(6), 945-952.
34. **Brenner, S., Stretton, A. & Kaplan, S., (1965).** Genetic code: the 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression. *Nature*, 206(4988), 994-998.
35. **Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T. & Eggert, T., (2006a).** Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 362(3), 393-402.
36. **Brockmeier, U., Wendorff, M. & Eggert, T., (2006b).** Versatile expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 52(2), 143-148.
37. **Browning, D. F. & Busby, S. J. W., (2004).** The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 57-65.
38. **Browning, D. F. & Busby, S. J. W., (2016).** Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 638-650.
39. **Brüser, T. & Sanders, C., (2003).** An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiological Research*, 158(1), 7-17.
40. **Buchanan, C. E. & Ling, M. L., (1992).** Isolation and sequence analysis of *dacB*, which encodes a sporulation-specific penicillin-binding protein in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 174(6), 1717-25.
41. **Burgess, R. R., (1971).** RNA Polymerase. *Annual Review of Biochemistry*, 40(1), 711-740.
42. **Burmeister, A., Hilgers, F., Langner, A., Westerwalbesloh, C., Kerkhoff, Y., Tenhaef, N., Drepper, T., Kohlheyer, D., Von Lieres, E. & Noack, S., (2019).** A microfluidic co-cultivation platform to investigate microbial interactions at defined microenvironments. *Lab on a Chip*, 19(1), 98-110.

43. **Cabantous, S., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S., (2004).** Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 23(1), 102-107.
44. **Cabantous, S. & Waldo, G. S., (2006).** *In vivo* and *in vitro* protein solubility assays using split GFP. *Nature Methods*, 3(10), 845-854.
45. **Carrier, T. A. & Keasling, J. D., (1997).** Controlling messenger RNA stability in bacteria: strategies for engineering gene expression. *Biotechnology Progress*, 13(6), 699-708.
46. **Caspers, M., Brockmeier, U., Degering, C., Eggert, T. & Freudl, R., (2010).** Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1877-1885.
47. **Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C., (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
48. **Chapman, J., Ismail, A. E. & Dinu, C. Z., (2018).** Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
49. **Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R. & Jay, E., (1994).** Determination of the optimal aligned spacing between the Shine–Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 22(23), 4953-4957.
50. **Chen, J., Fu, G., Gai, Y., Zheng, P., Zhang, D. & Wen, J., (2015).** Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression. *Microbial Cell Factories*, 14, 92.
51. **Chen, K. & Arnold, F. H., (2020).** Engineering new catalytic activities in enzymes. *Nature Catalysis*, 3(3), 203-213.
52. **Clark, E. D., (2001).** Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 202-207.
53. **Clark, M. F., Lister, R. M. & Bar-Joseph, M. 1986.** ELISA techniques. In: *Methods in Enzymology*. Ed.: Weissbach, A. & Weissbach, H. Academic Press, Cambridge, USA. 742-766
54. **Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W., (1993).** Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 32(5), 1212-1218.
55. **Cohn, F. (1872).** Ueber die Bacterien, die kleinsten lebenden Wesen. *Sammlung Gemeinverständlicher Wissenschaftlicher Vortrag*, 7, 1-35.
56. **Condon, C., (2003).** RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2), 157-174.
57. **Connolly, T. & Gilmore, R., (1989).** The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell*, 57(4), 599-610.

58. **Connolly, T., Rapiejko, P. J. & Gilmore, R., (1991).** Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science*, 252, 1171-1173.
59. **Crick, F. H., (1968).** The origin of the genetic code. *Journal of Molecular Biology*, 38(3), 367-379.
60. **Cristóbal, S., De Gier, J. W., Nielsen, H. & Von Heijne, G., (1999).** Competition between Sec-and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 18(11), 2982-2990.
61. **Cui, W., Han, L., Cheng, J., Liu, Z., Zhou, L., Guo, J. & Zhou, Z., (2016).** Engineering an inducible gene expression system for *Bacillus subtilis* from a strong constitutive promoter and a theophylline-activated synthetic riboswitch. *Microbial Cell Factories*, 15, 199.
62. **Cunningham, K. & Wickner, W., (1989).** Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(22), 8630-8634.
63. **Dalbey, R. E., Lively, M. O., Bron, S. & Diji, J. M. V., (1997).** The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Science*, 6(6), 1129-1138.
64. **Dalbey, R. E. & Von Heijne, G., (1992).** Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes-a new protease family. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(11), 474-478.
65. **Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J. & Silhavy, T. J., (1995).** The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes & Development*, 9(4), 387-398.
66. **Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O. P., Devine, K. M. & Diji, J. M. V., (2002).** A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsxRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184(2), 5661-5671.
67. **Davey, H. M. & Winson, M. K., (2003).** Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity. *Current Issues in Molecular Biology*, 5(1), 9-15.
68. **De Hoon, M. J. L., Makita, Y., Nakai, K. & Miyano, S., (2005).** Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLOS Computational Biology*, 1(3), e25.
69. **De Vrije, G., Batenburg, A., Killian, J. & De Kruijff, B., (1990).** Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 4(1), 143-150.
70. **Deana, A. & Belasco, J. G., (2005).** Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes & Development*, 19(21), 2526-2533.
71. **Degering, C., Eggert, T., Puls, M., Bongaerts, J., Evers, S., Maurer, K.-H. & Jaeger, K.-E., (2010).** Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6370-6376.

-
72. deHaseth, P. L., Zupancic, M. L. & Record, M. T., Jr., (1998). RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *Journal of Bacteriology*, 180(12), 3019-3025.
73. Deikus, G. & Bechhofer, D. H., (2009). *Bacillus subtilis trp* leader RNA: RNase J1 endonuclease cleavage specificity and PNPase processing. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39), 26394-26401.
74. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. & Charpentier, E., (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607.
75. Demain, A. L. & Vaishnav, P., (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306.
76. Doherty, G. P., Fogg, M. J., Wilkinson, A. J. & Lewis, P. J., (2010). Small subunits of RNA polymerase: localization, levels and implications for core enzyme composition. *Microbiology*, 156(12), 3532-3543.
77. Du Plessis, D. J., Nouwen, N. & Driessen, A. J., (2011). The sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1808(3), 851-865.
78. Dubnau, D., (2010). Swim or chill: lifestyles of a *Bacillus*. *Genes & Development*, 24(8), 735-737.
79. Duffy, J., Patham, B. & Mensa-Wilmot, K., (2010). Discovery of functional motifs in h-regions of trypanosome signal sequences. *Biochemical Journal*, 426(2), 135-145.
80. Dugaiczyk, A., Boyer, H. W. & Goodman, H. M., (1975). Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of Molecular Biology*, 96(1), 171-184.
81. Durand, S., Gilet, L., Bessières, P., Nicolas, P. & Condon, C., (2012a). Three essential ribonucleases—RNase Y, J1, and III—control the abundance of a majority of *Bacillus subtilis* mRNAs. *PLOS Genetics*, 8(3), e1002520.
82. Durand, S., Gilet, L. & Condon, C., (2012b). The Essential Function of *B. subtilis* RNase III Is to Silence Foreign Toxin Genes. *PLOS Genetics*, 8(12), e1003181.
83. Dusny, C. & Schmid, A., (2015). Microfluidic single-cell analysis links boundary environments and individual microbial phenotypes. *Environmental Microbiology*, 17(6), 1839-1856.
84. Earl, A. M., Losick, R. & Kolter, R., (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16(6), 269-275.
85. Edelheit, O., Hanukoglu, A. & Hanukoglu, I., (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnology*, 9, 61.
86. Eggeling, L., Bott, M. & Marienhagen, J., (2015). Novel screening methods — biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 35, 30-36.

-
87. Elvekrog, M. M. & Gonzalez, R. L., (2013). Conformational selection of translation initiation factor 3 signals proper substrate selection. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(5), 628-633.
88. Elvekrog, M. M. & Walter, P., (2015). Dynamics of co-translational protein targeting. *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, 79-86.
89. Erie, D. A., Hajiseyedjavadi, O., Young, M. C. & Von Hippel, P. H., (1993). Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription. *Science*, 262(5135), 867-873.
90. Errington, J. & Aart, L. T. V. D., (2020). Microbe profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425-427.
91. Facciotti, D., O'neal, J., Lee, S. & Shewmaker, C., (1985). Light-inducible expression of a chimeric gene in soybean tissue transformed with *Agrobacterium*. *Bio/Technology*, 3(3), 241-246.
92. Faß, S. H. & Engels, J. W., (1996). Influence of specific signal peptide mutations on the expression and secretion of the α -amylase inhibitor tendamistat in *Streptomyces lividans*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15244-15252.
93. Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G. J., (2000). Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(14), 4068-4076.
94. Fekkes, P. & Driessen, A. J., (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 161-173.
95. Freudl, R., (2013). Leaving home ain't easy: protein export systems in Gram-positive bacteria. *Research in Microbiology*, 164(6), 664-674.
96. Freudl, R., (2018). Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microbial Cell Factories*, 17, 52.
97. Fu, G., Liu, J., Li, J., Zhu, B. & Zhang, D., (2018). Systematic screening of optimal signal peptides for secretory production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(50), 13141-13151.
98. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A., (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, In: *The proteomics protocols handbook*, Ed. Walker, J., Humana Press, Totowa, USA, 571-607.
99. Garcion, C., Béven, L. & Foissac, X., (2021). Comparison of current methods for signal peptide prediction in phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, 12, 661524.
100. Giegé, R., (2008). Toward a more complete view of tRNA biology. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(10), 1007-1014.
101. Goddard, J.-P. & Reymond, J.-L., (2004a). Enzyme assays for high-throughput screening. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(4), 314-322.

102. **Goddard, J.-P. & Reymond, J.-L., (2004b)**. Recent advances in enzyme assays. *TRENDS in Biotechnology*, 22(7), 363-370.
103. **Gohlke, U., Pullan, L., Mcdevitt, C. A., Porcelli, I., De Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C., (2005)**. The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(30), 10482-10486.
104. **Gomes, A. R., Byregowda, S. M., Veeregowda, B. M. & Balamurugan, V., (2016)**. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(7), 346-356
105. **Goodman, D. B., Church, G. M. & Kosuri, S., (2013)**. Causes and effects of N-terminal codon bias in bacterial genes. *Science*, 342(6157), 475-479.
106. **Griffith, F., (1928)**. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, 27(2), 113-159.
107. **Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R. & Hofacker, I. L., (2008)**. The vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Issue suppl_2), W70-W74.
108. **Grunberg-Manago, M., (1999)**. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annual Review of Genetics*, 33(1), 193-227.
109. **Grünberger, A., Probst, C., Helfrich, S., Nanda, A., Stute, B., Wiechert, W., Von Lieres, E., Nöh, K., Frunzke, J. & Kohlheyer, D., (2015)**. Spatiotemporal microbial single-cell analysis using a high-throughput microfluidics cultivation platform. *Cytometry Part A*, 87(12), 1101-1115.
110. **Grünberger, A., Probst, C., Heyer, A., Wiechert, W., Frunzke, J. & Kohlheyer, D., (2013)**. Microfluidic picoliter bioreactor for microbial single-cell analysis: fabrication, system setup, and operation. *Journal of Visualized Experiments*, 82, 50560.
111. **Gu, Y., Xu, X., Wu, Y., Niu, T., Liu, Y., Li, J., Du, G. & Liu, L., (2018)**. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications. *Metabolic Engineering*, 50, 109-121.
112. **Gualerzi, C. O. & Pon, C. L., (1990)**. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry*, 29(25), 5881-5889.
113. **Gualerzi, C. O. & Pon, C. L., (2015)**. Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(22), 4341-4367.
114. **Guan, C., Cui, W., Cheng, J., Liu, R., Liu, Z., Zhou, L. & Zhou, Z., (2016)**. Construction of a highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis*. *New Biotechnology*, 33(3), 372-379.
115. **Guan, C., Cui, W., Cheng, J., Zhou, L., Guo, J., Hu, X., Xiao, G. & Zhou, Z., (2015a)**. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 14, 150.

-
116. Guan, C., Cui, W., He, X., Hu, X., Xu, J., Du, G., Chen, J. & Zhou, Z., (2015b). Construction and development of a novel expression system of *Streptomyces*. *Protein Expression and Purification*, 113, 17-22.
117. Guo, Y. & Gralla, J. D., (1998). Promoter opening via a DNA fork junction binding activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11655-11660.
118. Gusakov, A. V., Kondratyeva, E. G. & Sinitsyn, A. P., (2011). Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 283658.
119. Gusarov, I. & Nudler, E., (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Molecular Cell*, 3(4), 495-504.
120. Haldenwang, W. G., (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 59(1), 1-30.
121. Hambreus, G., Von Wachenfeldt, C. & Hederstedt, L., (2003). Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(5), 706-714.
122. Hanahan, D., (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.
123. Harwood, C. R., (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Biotechnology*, 10, 247-256.
124. Harwood, C. R. & Cranenburgh, R., (2008). *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends in Microbiology*, 16(2), 73-79.
125. Harwood, C. R. & Kikuchi, Y., (2021). The ins and outs of *Bacillus* proteases: activities, functions and commercial significance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1), fuab046.
126. Harwood, C. R. & Wipat, A., (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters*, 389(1), 84-87.
127. He, X. S., Shyu, Y. T., Nathoo, S., Wong, S. L. & Doi, R. H., (1991). Construction and use of a *Bacillus subtilis* mutant deficient in multiple protease genes for the expression of eukaryotic genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 646(1), 69-77.
128. Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y., (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12501-12504.
129. Heim, R. & Tsien, R. Y., (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, 6(2), 178-182.
130. Heins, A.-L. & Weuster-Botz, D., (2018). Population heterogeneity in microbial bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(7), 889-916.

131. **Helmann, J. D., (1995).** Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Research*, 23(13), 2351-2360.
132. **Hemmerich, J., Moch, M., Jurischka, S., Wiechert, W., Freudl, R. & Oldiges, M., (2019).** Combinatorial impact of Sec signal peptides from *Bacillus subtilis* and bioprocess conditions on heterologous cutinase secretion by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(3), 644-655.
133. **Henkin, T., Grundy, F., Nicholson, W. & Chambliss, G., (1991).** Catabolite repression of α amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Molecular Microbiology*, 5(3), 575-584.
134. **Hershey, J. W., Sonenberg, N. & Mathews, M. B., (2012).** Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a011528.
135. **Hill, S. C., Mayo, M. W. & Chang, R. K., (2009).** Fluorescence of bacteria, pollens, and naturally occurring airborne particles: excitation/emission spectra. *Army Research Laboratory*, ARL-TR-4722, <https://apps.dtic.mil/docs/citations/ADA494347>.
136. **Himanen, J.-P., Taira, S., Sarvas, M., Saris, P. & Runeberg-Nyman, K., (1990).** Expression of pertussis toxin subunit S4 as an intracytoplasmic protein in *Bacillus subtilis*. *Vaccine*, 8(6), 600-604.
137. **Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K. & Yamane, K., (2000).** Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology*, 146(1), 65-75.
138. **Hogenkamp, F., Hilgers, F., Knapp, A., Klaus, O., Bier, C., Binder, D., Jaeger, K.-E., Drepper, T. & Pietruszka, J., (2020).** Effect of photocaged isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside solubility on the light responsiveness of LacI-controlled expression systems in different bacteria. *ChemBioChem*, 22(3), 539-547.
139. **Holtkamp, W., Cunha, C. E., Peske, F., Konevega, A. L., Wintermeyer, W. & Rodnina, M. V., (2014a).** GTP hydrolysis by EF-G synchronizes tRNA movement on small and large ribosomal subunits. *The EMBO Journal*, 33(9), 1073-1085.
140. **Holtkamp, W., Wintermeyer, W. & Rodnina, M. V., (2014b).** Synchronous tRNA movements during translocation on the ribosome are orchestrated by elongation factor G and GTP hydrolysis. *Bioessays*, 36(10), 908-918.
141. **Honda, K., Nakamura, K., Nishiguchi, M. & Yamane, K., (1993).** Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *Journal of Bacteriology*, 175(15), 4885-4894.
142. **Hu, C.-D., Chinenov, Y. & Kerppola, T. K., (2002).** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, 9(4), 789-798.

143. **Huang, X. & Helmann, J. D., (1998).** Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* σ^X factor using a consensus-directed search. *Journal of Molecular Biology*, 279(1), 165-173.
144. **Hueck, C. J. & Hillen, W., (1995).** Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? *Molecular Microbiology*, 15(3), 395-401.
145. **Hui, M. P., Foley, P. L. & Belasco, J. G., (2014).** Messenger RNA degradation in bacterial cells. *Annual Review of Genetics*, 48, 537-559.
146. **Hyyryläinen, H.-L., Bolhuis, A., Darmon, E., Muukkonen, L., Koski, P., Vitikainen, M., Sarvas, M., Prágai, Z., Bron, S., Van Dijk, J. M. & Kontinen, V. P., (2001).** A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Molecular Microbiology*, 41(5), 1159-1172.
147. **Hyyryläinen, H.-L., Vitikainen, M., Thwaite, J., Wu, H., Sarvas, M., Harwood, C. R., Kontinen, V. P. & Stephenson, K., (2000).** D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 26696-26703.
148. **Hyyryläinen, H. L., Marciniak, B. C., Dahncke, K., Pietiäinen, M., Courtin, P., Vitikainen, M., Seppala, R., Otto, A., Becher, D., Chapot-Chartier, M. P., Kuipers, O. P. & Kontinen, V. P., (2010).** Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 77(1), 108-127.
149. **Inouye, S., Soberon, X., Franceschini, T., Nakamura, K., Itakura, K. & Inouye, M., (1982).** Role of positive charge on the amino-terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(11), 3438-3441.
150. **Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. & Boyer, H. W., (1977).** Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 198(4321), 1056-1063.
151. **Izard, J. W. & Kendall, D. A., (1994).** Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Molecular Microbiology*, 13(5), 765-773.
152. **Jaeger, K.-E. & Kovacic, F., (2014).** Determination of lipolytic enzyme activities. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 111-134.
153. **Jäger, V. D., Kloss, R., Grünberger, A., Seide, S., Hahn, D., Karmainski, T., Piqueray, M., Embruch, J., Longerich, S., Mackfeld, U., Jaeger, K. E., Wiechert, W., Pohl, M. & Krauss, U., (2019).** Tailoring the properties of (catalytically)-active inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 18, 33.
154. **Jäger, V. D., Lamm, R., Kloß, R., Kaganovitch, E., Grünberger, A., Pohl, M., Büchs, J., Jaeger, K.-E. & Krauss, U., (2018).** A synthetic reaction cascade implemented by colocalization of two proteins within catalytically active inclusion bodies. *ACS Synthetic Biology*, 7(9), 2282-2295.

155. Jeong, H., Jeong, D.-E., Park, S.-H., Kim, S. J. & Choi, S.-K., (2018). Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain WB800N, an extracellular protease-deficient derivative of strain 168. *Microbiology Resource Announcements*, 7(18), e01380-18.
156. Jeong, J.-Y., Yim, H.-S., Ryu, J.-Y., Lee, H. S., Lee, J.-H., Seen, D.-S. & Kang, S. G., (2012). One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5440-5443.
157. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A., (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233-239.
158. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E., (2012). A programmable dual-RNA guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
159. Johannes, T. W. & Zhao, H., (2006). Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), 261-267.
160. Jürgen, B., Schweder, T. & Hecker, M., (1998). The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site. *Molecular and General Genetics*, 258(5), 538-545.
161. Jurischka, S., Bida, A., Dohmen-Olma, D., Kleine, B., Potzkei, J., Binder, S., Schaumann, G., Bakkes, P. J. & Freudl, R., (2020). A secretion biosensor for monitoring Sec-dependent protein export in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories*, 19, 11.
162. Käll, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E. L., (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, 35(supple_2), W429-W432.
163. Kallio, P. T., Fagelson, J. E., Hoch, J. A. & Strauch, M. A., (1991). The transition state regulator Hpr of *Bacillus subtilis* is a DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 266(20), 13411-13417.
164. Kaltwasser, H. & Schlegel, H. G., (1966). NADH-dependent coupled enzyme assay for urease and other ammonia-producing systems. *Analytical Biochemistry*, 16(1), 132-138.
165. Kamiyama, D., Sekine, S., Barsi-Rhyne, B., Hu, J., Chen, B., Gilbert, L. A., Ishikawa, H., Leonetti, M. D., Marshall, W. F., Weissman, J. S. & Huang, B., (2016). Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein. *Nature Communications*, 7, 11046.
166. Kapp, L. D. & Lorsch, J. R., (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 657-704.
167. Kapralek, F., Ječmen, P., Sedláček, J., Fabry, M. & Zdražil, S., (1991). Fermentation conditions for high-level expression of the *tac*-promoter-controlled calf prochymosin cDNA in *Escherichia coli* HB101. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(1), 71-79.
168. Kasana, R. C., Salwan, R. & Yadav, S. K., (2011). Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(3), 262-276.

169. Kawaguchi, S. I., Müller, J., Linde, D., Kuramitsu, S., Shibata, T., Inoue, Y., Vassylyev, D. G. & Yokoyama, S., (2001). The crystal structure of the ttCsaA protein: an export-related chaperone from *Thermus thermophilus*. *The EMBO Journal*, 20(3), 562-569.
170. Khmelinskii, A., Meurer, M., Ho, C.-T., Besenbeck, B., Füller, J., Lemberg, M. K., Bukau, B., Mogk, A. & Knop, M., (2016). Incomplete proteasomal degradation of green fluorescent proteins in the context of tandem fluorescent protein timers. *Molecular Biology of the Cell*, 27(2), 360-370.
171. Kim, I. J., Ko, H.-J., Kim, T.-W., Nam, K. H., Choi, I.-G. & Kim, K. H., (2013). Binding characteristics of a bacterial expansin (Bs EXLX1) for various types of pretreated lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5381-5388.
172. Kisselev, L., Ehrenberg, M. & Frolova, L., (2003). Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *The EMBO Journal*, 22(2), 175-182.
173. Knapp, A., Rippahn, M., Volkenborn, K., Skoczinski, P. & Jaeger, K.-E., (2017). Activity-independent screening of secreted proteins using split GFP. *Journal of Biotechnology*, 258, 110-116.
174. Koeller, K. M. & Wong, C.-H., (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, 409(6817), 232-240.
175. Kontinen, V., Saris, P. & Sarvas, M., (1991). A gene (*prsA*) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. *Molecular Microbiology*, 5(5), 1273-1283.
176. Koressaar, T. & Remm, M., (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289-1291.
177. Kouwen, T. R., Dubois, J.-Y. F., Freudl, R., Quax, W. J. & Van Dijk, J. M., (2008). Modulation of thiol-disulfide oxidoreductases for increased production of disulfide-bond-containing proteins in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7536-7545.
178. Kouwen, T. R., Van Der Goot, A., Dorenbos, R., Winter, T., Antelmann, H., Plaisier, M. C., Quax, W. J., Van Dijk, J. M. & Dubois, J. Y. F., (2007). Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 64(4), 984-999.
179. Kračun, S. K., Schückel, J., Westereng, B., Thygesen, L. G., Monrad, R. N., Eijsink, V. G. H. & Willats, W. G. T., (2015). A new generation of versatile chromogenic substrates for high-throughput analysis of biomass-degrading enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 70.
180. Kremers, G.-J., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W. & Piston, D. W., (2011). Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(2), 157-160.
181. Kumar, A. & Singh, S., (2013). Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), 365-378.
182. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M., Bessières, P., Bolotin, A. & Borchert, S., (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256.

183. **Kushner, S. R., (2002).** mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *Journal of Bacteriology*, 184(17), 4658-4665.
184. **Kyte, J. & Doolittle, R. F., (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132.
185. **Labrou, N. E. 2014.** Protein purification: an overview, In: *Protein Downstream Processing: Design, Development and Application of High and Low-Resolution Methods*, Ed. Labrou, N. E., Humana Press, Totowa, USA, 3-10.
186. **Laemmli, U. K., (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
187. **Lakkaraju, A. K. K., Mary, C., Scherrer, A., Johnson, A. E. & Strub, K., (2008).** SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites. *Cell*, 133(3), 440-451.
188. **Lambert, T. J., (2019).** FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nature Methods*, 16(4), 277-278.
189. **Lammertyn, E., Desmyter, S., Schacht, S., Van Mellaert, L. & Anné, J., (1998).** Influence of charge variation in the *Streptomyces venezuelae* α -amylase signal peptide on heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(4), 424-430.
190. **Lausberg, F., Fleckenstein, S., Kreutzenbeck, P., Fröbel, J., Rose, P., Müller, M. & Freudl, R., (2012).** Genetic evidence for a tight cooperation of TatB and TatC during productive recognition of twin-arginine (Tat) signal peptides in *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, 7(6), e39867.
191. **Lee, H. C. & Bernstein, H. D., (2001).** The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3471-3476.
192. **Lee, S. J., Kim, D. M., Bae, K. H., Byun, S. M. & Chung, J. H., (2000).** Enhancement of secretion and extracellular stability of staphylokinase in *Bacillus subtilis* by *wprA* gene disruption. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 476-480.
193. **Lehnik-Habrink, M., Lewis, R. J., Mäder, U. & Stülke, J., (2012).** RNA degradation in *Bacillus subtilis*: an interplay of essential endo- and exoribonucleases. *Molecular Microbiology*, 84(6), 1005-1017.
194. **Lehnik-Habrink, M., Schaffer, M., Mäder, U., Diethmaier, C., Herzberg, C. & Stülke, J., (2011).** RNA processing in *Bacillus subtilis*: identification of targets of the essential RNase Y. *Molecular Microbiology*, 81(6), 1459-1473.
195. **Leloup, L., Petit-Glatron, M.-F., Chambert, R. & Le Saux, J., (1999).** Kinetics of the secretion of *Bacillus subtilis* levanase overproduced during the exponential phase of growth. *Microbiology*, 145(3), 613-619.

-
196. Lenz, P., Hilgers, F., Burmeister, A., Zimmermann, L., Volkenborn, K., Grünberger, A., Kohlheyer, D., Drepper, T., Jaeger, K.-E. & Knapp, A., (2021). The iSplit GFP assay detects intracellular recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 20, 174.
197. Li, H., Faury, D. & Morosoli, R., (2006). Impact of amino acid changes in the signal peptide on the secretion of the Tat-dependent xylanase C from *Streptomyces lividans*. *FEMS Microbiology Letters*, 255(2), 268-274.
198. Li, K., Yuan, X.-X., Sun, H.-M., Zhao, L.-S., Tang, R., Chen, Z.-H., Qin, Q.-L., Chen, X.-L., Zhang, Y.-Z. & Su, H.-N., (2018). Atomic force microscopy of side wall and septa peptidoglycan from *Bacillus subtilis* reveals an architectural remodeling during growth. *Frontiers in Microbiology*, 9, 620.
199. Li, W., Zhou, X. & Lu, P., (2004). Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*, 155(8), 605-610.
200. Lindner, A. B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E. J. & Taddei, F., (2008). Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3076-3081.
201. Lindner, C., Stülke, J. & Hecker, M., (1994). Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 140(4), 753-757.
202. Liu, H., Wang, X., Yang, S., Wang, R. & Wang, T., (2019). Saturation mutagenesis and self-inducible expression of trehalose synthase in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, 35(4), e2826.
203. Liu, L., Liu, Y., Shin, H.-D., Chen, R. R., Wang, N. S., Li, J., Du, G. & Chen, J., (2013). Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6113-6127.
204. Liu, X., Wang, H., Wang, B. & Pan, L., (2018). Efficient production of extracellular pullulanase in *Bacillus subtilis* ATCC6051 using the host strain construction and promoter optimization expression system. *Microbial Cell Factories*, 17, 163.
205. Løbner-Olesen, A., (1999). Distribution of minichromosomes in individual *Escherichia coli* cells: implications for replication control. *The EMBO Journal*, 18(6), 1712-1721.
206. Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F. & Hofacker, I. L., (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 26.
207. Lorenz, U., (2011). Protein tyrosine phosphatase assays. *Current Protocols in Immunology*, 93, 11.7.1-11.7.12.
208. Lowery-Goldhammer, C. & Richardson, J. P., (1974). An RNA-dependent nucleoside triphosphate phosphohydrolase (ATPase) associated with rho termination factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(5), 2003-2007.

-
209. **Luirink, J., Heijne, G. V., Houben, E. & Gier, J.-W. D., (2005).** Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annual Reviews Microbiology*, 59, 329-355.
210. **Lutz, R. & Bujard, H., (1997).** Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I₁-I₂ regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 25(6), 1203-1210.
211. **Lyon, W. R., Gibson, C. M. & Caparon, M. G., (1998).** A role for trigger factor and an Rgg-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. *The EMBO Journal*, 17(21), 6263-6275.
212. **Mäder, U., Antelmann, H., Buder, T., Dahl, M., Hecker, M. & Homuth, G., (2003).** *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(4), 455-467.
213. **Mäder, U., Homuth, G., Scharf, C., Büttner, K., Bode, R. & Hecker, M., (2002).** Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression modulated by amino acid availability. *Journal of Bacteriology*, 184(15), 4288-4295.
214. **Mahr, R. & Frunzke, J., (2016).** Transcription factor-based biosensors in biotechnology: current state and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 79-90.
215. **Malten, M., Nahrstedt, H., Meinhardt, F. & Jahn, D., (2005).** Coexpression of the type I signal peptidase gene *sipM* increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(5), 616-621.
216. **Marciniak, B. C., Pabijaniak, M., De Jong, A., Dühring, R., Seidel, G., Hillen, W. & Kuipers, O. P., (2012).** High- and low-affinity cre boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. *BMC Genomics*, 13, 401.
217. **Margot, P. & Karamata, D., (1996).** The *wprA* gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease. *Microbiology*, 142(12), 3437-3444.
218. **Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J., (2010).** CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 181-190.
219. **Marston, F. A., (1986).** The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal*, 240(1), 1-12.
220. **Mathiesen, G., Sveen, A., Brurberg, M. B., Fredriksen, L., Axelsson, L. & Eijsink, V. G., (2009).** Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics*, 10, 425.
221. **Mathy, N., Bénard, L., Pellegrini, O., Daou, R., Wen, T. & Condon, C., (2007).** 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell*, 129(4), 681-692.
222. **Meijer, W. J. & Salas, M., (2004).** Relevance of UP elements for three strong *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 promoters. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 1166-1176.

-
223. **Mergulhao, F., Taipa, M., Cabral, J. & Monteiro, G., (2004).** Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 109(1-2), 31-43.
224. **Merril, C. R., (1990).** Gel-staining techniques, In: *Methods in Enzymology*, 182, Ed. Deutscher P. M., Academic Press, Cambridge, USA, 477-488.
225. **Mital, S., Christie, G. & Dikicioglu, D., (2021).** Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microbial Cell Factories*, 20, 208.
226. **Monteferrante, C. G., Mackichan, C., Marchadier, E., Prejean, M. V., Carballido-López, R. & Van Dijl, J. M., (2013).** Mapping the twin-arginine protein translocation network of *Bacillus subtilis*. *Proteomics*, 13(5), 800-811.
227. **Mooney, R. A., Artsimovitch, I. & Landick, R., (1998).** Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation. *Journal of Bacteriology*, 180(13), 3265-3275.
228. **Moran, C. P., Lang, N., Legrice, S. F., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A., Pero, J. & Losick, R., (1982).** Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, 186(3), 339-346.
229. **Mori, H. & Cline, K., (2002).** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. *The Journal of Cell Biology*, 157(2), 205-210.
230. **Moszer, I., Glaser, P. & Danchin, A., (1995).** SubtiList: a relational database for the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology*, 141(2), 261-268.
231. **Msadek, T., Kunst, F. & Rapoport, G., (1995).** A signal transduction network in *Bacillus subtilis* includes the DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems, In: *Two-Component Signal Transduction*, Ed. Hoch, A. J., Silhavy, J. T., ASM Press, Washington, USA, 447-471.
232. **Mulder, K. C., Bandola, J. & Schumann, W., (2013).** Construction of an artificial *secYEG* operon allowing high level secretion of α -amylase. *Protein Expression and Purification*, 89(1), 92-96.
233. **Müller, C., Igwe, C. L., Wiechert, W. & Oldiges, M., (2021a).** Scaling production of GFP1-10 detector protein in *E. coli* for secretion screening by split GFP assay. *Microbial Cell Factories*, 20, 191.
234. **Müller, J., Walter, F., Van Dijl, J. M. & Behnke, D., (1992).** Suppression of the growth and export defects of an *Escherichia coli secA* Ts) mutant by a gene cloned from *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, 235(1), 89-96.
235. **Müller, J. P., Bron, S., Venema, G. & Van Dijl, J. M., (2000).** Chaperone-like activities of the CsaA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 146(1), 77-88.
236. **Müller, M., (2018).** Post-translational modifications of protein backbones: unique functions, mechanisms, and challenges. *Biochemistry*, 57(2), 177-185.

237. Müller, M., Calvert, M., Hottmann, I., Kluj, R. M., Teufel, T., Balbuchta, K., Engelbrecht, A., Selim, K. A., Xu, Q., Borisova, M., Titz, A. & Mayer, C., (2021b). The exo- β -N-acetylmuramidase NamZ from *Bacillus subtilis* is the founding member of a family of exo-lytic peptidoglycan hexosaminidases. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100519.
238. Mustafi, N., Grünberger, A., Kohlheyer, D., Bott, M. & Frunzke, J., (2012). The development and application of a single-cell biosensor for the detection of l-methionine and branched-chain amino acids. *Metabolic Engineering*, 14(4), 449-457.
239. Nakamura, A., Koide, Y., Miyazaki, H., Kitamura, A., Masaki, H., Beppu, T. & Uozumi, T., (1992). Gene cloning and characterization of a novel extracellular ribonuclease of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 209(1), 121-127.
240. Nakamura, K., Nishiguchi, M., Honda, K. & Yamane, K., (1994). The *Bacillus subtilis* SRP54 homologue, Ffh, has an intrinsic GTPase activity and forms a ribonucleoprotein complex with small cytoplasmic RNA *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199(3), 1394-1399.
241. Nakamura, K., Yahagi, S.-I., Yamazaki, T. & Yamane, K., (1999). *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBSu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13569-13576.
242. Nakamura, Y. & Ito, K., (2011). tRNA mimicry in translation termination and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(5), 647-668.
243. Nasser, W., Awade, A., Reverchon, S. & Robert-Baudouy, J., (1993). Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Letters*, 335(3), 319-326.
244. Natale, P., Brüser, T. & Driessen, A. J. M., (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1778(9), 1735-1756.
245. Neef, J., Bongiorno, C., Schmidt, B., Goosens, V. J. & Van Dijl, J. M., (2020). Relative contributions of non-essential Sec pathway components and cell envelope-associated proteases to high-level enzyme secretion by *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 19, 52.
246. Neubauer, P., Hofmann, K., Holst, O., Mattiasson, B. & Kruschke, P., (1992). Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(6), 739-744.
247. Neubauer, P., Wolff, C., Hecker, M., Hofmann, K., Meyer, L., Kruschke, P. & Heinrich, H., (1991). Introduction of the *tac*-promoter by lactose under fermentation conditions. *Acta Biotechnologica*, 11(1), 23-29.
248. Nguyen, H. D., Phan, T. T. P. & Schumann, W., (2007). Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 55(2), 89-93.
249. Nguyen, H. D., Phan, T. T. P. & Schumann, W., (2011). Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant proteins on the cell wall. *AMB Express*, 1, 22.

250. **Noone, D., Howell, A., Collery, R. & Devine, K. M., (2001).** YkdA and YvtA, HtrA-like serine proteases in *Bacillus subtilis*, engage in negative autoregulation and reciprocal cross-regulation of *ykdA* and *yvtA* gene expression. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 654-663.
251. **Ölçücü, G., Klaus, O., Jaeger, K.-E., Drepper, T. & Krauss, U., (2021).** Emerging solutions for *in vivo* biocatalyst immobilization: tailor-made catalysts for industrial biocatalysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(27), 8919-8945.
252. **Opperman, T. & Richardson, J. P., (1994).** Phylogenetic analysis of sequences from diverse bacteria with homology to the *Escherichia coli rho* gene. *Journal of Bacteriology*, 176(16), 5033-5043.
253. **Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J., (1996).** Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273(5280), 1392-1395.
254. **Öztürk, S., Ergün, B. G. & Çalık, P., (2017).** Double promoter expression systems for recombinant protein production by industrial microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(20), 7459-7475.
255. **Palmer, T. & Berks, B. C., (2012).** The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology*, 10(7), 483-496.
256. **Panayotatos, N., (1988).** Recombinant protein production with minimal-antibiotic-resistance vectors. *Gene*, 74(2), 357-363.
257. **Park, S. & Schumann, W., (2015).** Optimization of the secretion pathway for heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(4), 623-633.
258. **Patterson, G., Day, R. N. & Piston, D., (2001).** Fluorescent protein spectra. *Journal of Cell Science*, 114(5), 837-838.
259. **Pearson, K., (1895).** VII. Note on regression and inheritance in the case of two parents. *Proceedings of the Royal Society of London*, 58(347-352), 240-242.
260. **Pechmann, S., Chartron, J. W. & Frydman, J., (2014).** Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP *in vivo*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(12), 1100-1105.
261. **Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S., (2005).** Engineering and characterization of a *superfolder* green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 24, 79-88.
262. **Pedreira, T., Elfmann, C. & Stülke, J., (2021).** The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D875-D882.
263. **Peterson, G. L., (1977).** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356.
264. **Peterson, J. H., Woolhead, C. A. & Bernstein, H. D., (2003).** Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 46155-46162.

265. Phan, T. T. P., Nguyen, H. D. & Schumann, W., (2006). Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, 46(2), 189-195.
266. Phan, T. T. P., Nguyen, H. D. & Schumann, W., (2012). Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 167-172.
267. Phan, T. T. P., Tran, L. T., Schumann, W. & Nguyen, H. D., (2015). Development of *Pgrac100*-based expression vectors allowing high protein production levels in *Bacillus subtilis* and relatively low basal expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 14, 72.
268. Pickersgill, R., Jenkins, J., Harris, G., Nasser, W. & Robert-Baudouy, J., (1994). The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1(10), 717-723.
269. Pohl, S., Bhavsar, G., Hulme, J., Bloor, A. E., Misirli, G., Leckenby, M. W., Radford, D. S., Smith, W., Wipat, A. & Williamson, E. D., (2013). Proteomic analysis of *Bacillus subtilis* strains engineered for improved production of heterologous proteins. *Proteomics*, 13(22), 3298-3308.
270. Pribnow, D., (1975). Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(3), 784-788.
271. Probst, C., Grünberger, A., Braun, N., Helfrich, S., Nöh, K., Wiechert, W. & Kohlheyer, D., (2015). Rapid inoculation of single bacteria into parallel picoliter fermentation chambers. *Analytical Methods*, 7(1), 91-98.
272. Quax, W., (1997). Merits of secretion of heterologous proteins from industrial microorganisms. *Folia Microbiologica*, 42(2), 99-103.
273. Quesada-Ganuza, A., Antelo-Varela, M., Mouritzen, J. C., Bartel, J., Becher, D., Gjermansen, M., Hallin, P. F., Appel, K. F., Kilstrup, M., Rasmussen, M. D. & Nielsen, A. K., (2019). Identification and optimization of PrsA in *Bacillus subtilis* for improved yield of amylase. *Microbial Cell Factories*, 18, 158.
274. Rader, R. A. & Langer, E. S., (2018). Fifteen years of progress: biopharmaceutical industry survey results. *Pharmaceutical Technology*, 30(7), 10-12.
275. Ramakrishnan, V., (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108(4), 557-572.
276. Raveh, A., Margalioth, M., Sontag, E. D. & Tuller, T., (2016). A model for competition for ribosomes in the cell. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(116), 20151062.
277. Ravn, P., Arnau, J., Madsen, S. M., Vrang, A. & Israelsen, H., (2003). Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 149(8), 2193-2201.
278. Reichard, E. L., Chirico, G. G., Dewey, W. J., Nassif, N. D., Bard, K. E., Millas, N. E. & Kraut, D. A., (2016). Substrate ubiquitination controls the unfolding ability of the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 291(35), 18547-18561.

-
279. **Rettenbacher, L. A., Arauzo-Aguilera, K., Buscajoni, L., Castillo-Corujo, A., Ferrero-Bordera, B., Kostopoulou, A., Moran-Torres, R., Núñez-Nepomuceno, D., Öktem, A. & Palma, A., (2021).** Microbial protein cell factories fight back? *Trends in Biotechnology*. S0167-7799(21)00230-4. Epub ahead of print.
280. **Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S. & Iorio, G., (2007).** The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(3), 129-145.
281. **Richards, J., Liu, Q., Pellegrini, O., Celesnik, H., Yao, S., Bechhofer, D. H., Condon, C. & Belasco, J. G., (2011).** An RNA pyrophosphohydrolase triggers 5'-exonucleolytic degradation of mRNA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Cell*, 43(6), 940-949.
282. **Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E. & Gautieri, A., (2018).** Review: engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, 2(1), 011501.
283. **Rocha, E. P. C., Danchin, A. & Viari, A., (1999).** Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Research*, 27(17), 3567-3576.
284. **Rodnina, M. V., (2013).** The ribosome as a versatile catalyst: reactions at the peptidyl transferase center. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(4), 595-602.
285. **Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W., (2016).** Protein elongation, co-translational folding and targeting. *Journal of Molecular Biology*, 428(10), 2165-2185.
286. **Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A., (2014).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.
287. **Rusch, S. L. & Kendall, D. A., (2007).** Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry*, 46(34), 9665-9673.
288. **Ryan, P., Robbins, A., Whealy, M. & Enquist, L., (1993).** Overall signal sequence hydrophobicity determines the *in vivo* translocation efficiency of a herpesvirus glycoprotein. *Virus Genes*, 7(1), 5-21.
289. **Saecker, R. M., Record, M. T. & Dehaseth, P. L., (2011).** Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase - promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and initiation of RNA synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 412(5), 754-771.
290. **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A., (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
291. **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
292. **Santos-Aberturas, J., Dörr, M., Waldo, G. S. & Bornscheuer, U. T., (2015).** In-depth high-throughput screening of protein engineering libraries by split-GFP direct crude cell extract data normalization. *Chemistry & Biology*, 22(10), 1406-1414.

293. Sarvas, M., Harwood, C. R., Bron, S. & Van Dijk, J. M., (2004). Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 311-327.
294. Sauer, C., Ver Loren Van Themaat, E., Boender, L. G. M., Groothuis, D., Cruz, R., Hamoen, L. W., Harwood, C. R. & Van Rij, T., (2018). Exploring the nonconserved sequence space of synthetic expression modules in *Bacillus subtilis*. *ACS Synthetic Biology*, 7(7), 1773-1784.
295. Schallmeyer, M., Frunzke, J., Eggeling, L. & Marienhagen, J., (2014). Looking for the pick of the bunch: high-throughput screening of producing microorganisms with biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 148-154.
296. Schallmeyer, M., Singh, A. & Ward, O. P., (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17.
297. Schein, C. H., (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology*, 7(11), 1141-1149.
298. Schiebel, E., Driessen, A. J., Hartl, F.-U. & Wickner, W., (1991). $\Delta\mu\text{H}^+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell*, 64(5), 927-939.
299. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S. & Schmid, B., (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682.
300. Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V., (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, 461(7268), 1234-1242.
301. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J., (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
302. Schumann, W. 2007. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Advances in Applied Microbiology*, 62, 137-189
303. Selle, K. & Barrangou, R., (2015). Harnessing CRISPR-Cas systems for bacterial genome editing. *Trends in Microbiology*, 23(4), 225-232.
304. Serganov, A. & Nudler, E., (2013). A decade of riboswitches. *Cell*, 152(1-2), 17-24.
305. Shahbalian, K., Jamalli, A., Zig, L. & Putzer, H., (2009). RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, 28(22), 3523-3533.
306. Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E. & Tsien, R. Y., (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1567-1572.
307. Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y., (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), 905-909.
308. Shank, E. A. & Kolter, R., (2011). Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 14(6), 741-747.

-
309. **Sharp, J. S. & Bechhofer, D. H., (2005).** Effect of 5'-proximal elements on decay of a model mRNA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 57(2), 484-495.
310. **Shazand, K., Tucker, J., Chiang, R., Stansmore, K., Sperling-Petersen, H., Grunberg-Manago, M., Rabinowitz, J. & Leighton, T., (1990).** Isolation and molecular genetic characterization of the *Bacillus subtilis* gene (*infB*) encoding protein synthesis initiation factor 2. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2675-2687.
311. **Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y., (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3), 223-239.
312. **Shine, J. & Dalgarno, L., (1975).** Terminal-sequence analysis of bacterial ribosomal RNA: correlation between the 3'-terminal-polypyrimidine sequence of 16-S RNA and translational specificity of the ribosome. *European Journal of Biochemistry*, 57(1), 221-230.
313. **Shurtleff, W. & Aoyagi, A. (2012).** *History of Natto and Its Relatives (1405-2012)*, Soyinfo Center.
314. **Siegele, D. A. & Hu, J. C., (1997).** Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(15), 8168-8172.
315. **Sigler, P. B., (1975).** An analysis of the structure of tRNA. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 4(1), 477-527.
316. **Skoczinski, P., Volkenborn, K., Fulton, A., Bhadauriya, A., Nutschel, C., Gohlke, H., Knapp, A. & Jaeger, K.-E., (2017).** Contribution of single amino acid and codon substitutions to the production and secretion of a lipase by *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 16, 160.
317. **Sloma, A., Ally, A., Ally, D. & Pero, J., (1988).** Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 170(12), 5557-5563.
318. **Snapp, E., (2005).** Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. *Current Protocols in Cell Biology*, 27, 21.4.1-21.4.13.
319. **Song, Y., Nikoloff, J. M., Fu, G., Chen, J., Li, Q., Xie, N., Zheng, P., Sun, J. & Zhang, D., (2016).** Promoter screening from *Bacillus subtilis* in various conditions hunting for synthetic biology and industrial applications. *PLOS ONE*, 11(7), e0158447.
320. **Spizizen, J., (1958).** Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(10), 1072-1078.
321. **Stavrakoudis, A., Demetropoulos, I. N., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M. & Tsikaris, V., (1997).** Design, synthesis and catalytic activity of a serine protease synthetic model. *Letters in Peptide Science*, 4(4), 481-487.
322. **Stein, T., (2005).** *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857.

-
323. **Steinmetz, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Gonzy-Tréboul, G. & Gay, P., (1985).** The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Molecular and General Genetics*, 200(2), 220-228.
324. **Stephenson, K. & Harwood, C. R., (1998).** Influence of a cell-wall-associated protease on production of α -amylase by *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 2875-2881.
325. **Studier, F. W. & Moffatt, B. A., (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130.
326. **Stülke, J. & Hillen, W., (1999).** Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 195-201.
327. **Su, Y., Liu, C., Fang, H. & Zhang, D., (2020).** *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19, 173.
328. **Sydow, J. F. & Cramer, P., (2009).** RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(6), 732-739.
329. **Teufel, F., Armenteros, J. J. A., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., Von Heijne, G. & Nielsen, H., (2021).** SignalP 6.0 achieves signal peptide prediction across all types using protein language models. *BioRxiv*, 2021.06.09.447770.
330. **Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D. H., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.-Y. F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W. J., Kuipers, O. P., Bron, S., Hecker, M. & Van Dijk, J. M., (2004).** Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 207-233.
331. **Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D. H., Bron, S. & Dijk, J. M. V., (2000).** Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: A genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 515-547.
332. **Tjalsma, H., Bolhuis, A., Van Roosmalen, M. L., Wiegert, T., Schumann, W., Broekhuizen, C. P., Quax, W. J., Venema, G., Bron, S. & Van Dijk, J. M., (1998).** Functional analysis of the secretory precursor processing machinery of *Bacillus subtilis*: identification of a eubacterial homolog of archaeal and eukaryotic signal peptidases. *Genes & Development*, 12(15), 2318-2331.
333. **Tjalsma, H., Kontinen, V. P., Prágai, Z., Wu, H., Meima, R., Venema, G., Bron, S., Sarvas, M. & Van Dijk, J. M., (1999).** The role of lipoprotein processing by signal peptidase II in the gram-positive eubacterium *Bacillus subtilis*: signal peptidase II is required for the efficient secretion of α -amylase, a non-lipoprotein *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1698-1707.
334. **Tjalsma, H., Noback, M. A., Bron, S., Venema, G., Yamane, K. & Van Dijk, J. M., (1997).** *Bacillus subtilis* contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities: constitutive and temporally controlled expression of different *sip* genes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25983-25992.

335. Tracy, B. P., Gaida, S. M. & Papoutsakis, E. T., (2010). Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(1), 85-99.
336. Tran, D. T. M., Phan, T. T. P., Doan, T. T. N., Tran, T. L., Schumann, W. & Nguyen, H. D., (2020). Integrative expression vectors with *Pgrac* promoters for inducer-free overproduction of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Reports*, 28, e00540.
337. Tran, D. T. M., Phan, T. T. P., Huynh, T. K., Dang, N. T. K., Huynh, P. T. K., Nguyen, T. M., Truong, T. T. T., Tran, T. L., Schumann, W. & Nguyen, H. D., (2017). Development of inducer-free expression plasmids based on IPTG-inducible promoters for *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 16, 130.
338. Trauth, J., Scheffer, J., Hasenjäger, S. & Taxis, C., (2020). Strategies to investigate protein turnover with fluorescent protein reporters in eukaryotic organisms. *AIMS Biophysics*, 7(2), 90-118.
339. Trip, H., Van Der Veek, P. J., Renniers, T. C., Meima, R., Sagt, C. M., Mohrmann, L. & Kuipers, O. P., (2011). A novel screening system for secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbial Biotechnology*, 4(5), 673-682.
340. Tripathi, N. K. & Shrivastava, A., (2019). Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 420.
341. Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Kohno, T. & Maturana, A. D., (2011). Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*, 474(7350), 235-238.
342. Ullmann, A. 2009. *Escherichia coli* lactose operon. In: *Encyclopedia of Lifesciences*. (Ed.)
343. Unoson, C. & Wagner, E. G. H., (2007). Dealing with stable structures at ribosome binding sites: bacterial translation and ribosome standby. *RNA Biology*, 4(3), 113-117.
344. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G., (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115.
345. Valent, Q. A., De Gier, J. W. L., Heijne, G. V., Kendall, D. A., Ten Hagen-Jongman, C. M., Oudega, B. & Luirink, J., (1997). Nascent membrane and presecretory proteins synthesized in *Escherichia coli* associate with signal recognition particle and trigger factor. *Molecular Microbiology*, 25(1), 53-64.
346. Van Der Wolk, J. P., De Wit, J. G. & Driessen, A. J., (1997). The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *The EMBO Journal*, 16(24), 7297-7304.
347. Van Roosmalen, M. L., Geukens, N., Jongbloed, J. D. H., Tjalsma, H., Dubois, J.-Y. F., Bron, S., Van Dijk, J. M. & Anné, J., (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 279-297.

348. **Van Rossum, T., Kengen, S. W. & Van Der Oost, J., (2013).** Reporter-based screening and selection of enzymes. *The FEBS Journal*, 280(13), 2979-2996.
349. **Van Wely, K. H., Swaving, J., Freudl, R. & Driessen, A. J., (2001).** Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(4), 437-454.
350. **Vargas-Blanco, D. A. & Shell, S. S., (2020).** Regulation of mRNA stability during bacterial stress responses. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2111.
351. **Vellanoweth, R. L. & Rabinowitz, J. C., (1992).** The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo. *Molecular Microbiology*, 6(9), 1105-1114.
352. **Verma, A., Agrahari, S., Rastogi, S. & Singh, A., (2011).** Biotechnology in the realm of history. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 3(3), 321-323.
353. **Vieira, J. & Messing, J., (1982).** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19(3), 259-268.
354. **Vitikainen, M., Hyyryläinen, H. L., Kivimäki, A., Kontinen, V. & Sarvas, M., (2005).** Secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* can be improved by engineering cell components affecting post-translocational protein folding and degradation. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 363-375.
355. **Vitikainen, M., Lappalainen, I., Seppala, R., Antelmann, H., Boer, H., Taira, S., Savilahti, H., Hecker, M., Vihinen, M., Sarvas, M. & Kontinen, V. P., (2004).** Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 19302-19314.
356. **Vogelstein, B. & Gillespie, D., (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 76(2), 615-619.
357. **Volkenborn, K., Kuschmierz, L., Benz, N., Lenz, P., Knapp, A. & Jaeger, K.-E., (2020).** The length of ribosomal binding site spacer sequence controls the production yield for intracellular and secreted proteins by *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 19, 154.
358. **Von Heijne, G., (1984).** How signal sequences maintain cleavage specificity. *Journal of Molecular Biology*, 173(2), 243-251.
359. **Von Heijne, G., (1990).** The signal peptide. *The Journal of Membrane Biology*, 115(3), 195-201.
360. **Von Heijne, G. & Abrahmsèn, L., (1989).** Species-specific variation in signal peptide design implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Letters*, 244(2), 439-446.
361. **Voorhees, R. M. & Ramakrishnan, V., (2013).** Structural basis of the translational elongation cycle. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 203-236.

362. **Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. & Terwilliger, T. C., (1999).** Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 17(7), 691-695.
363. **Walsh, G., (2018).** Biopharmaceuticals benchmarks. *Nature Biotechnology*, 36, 1136-1145.
364. **Wang, G., Xia, Y., Gu, Z., Zhang, H., Chen, Y. Q., Chen, H., Ai, L. & Chen, W., (2015).** A new potential secretion pathway for recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 14, 179.
365. **Wang, L., Miller, A. & Kendall, D. A., (2000).** Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10154-10159.
366. **Wang, P.-Z. & Doi, R. H., (1984).** Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* sigma 55 and sigma 37 RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases. *Journal of Biological Chemistry*, 259(13), 8619-8625.
367. **Washburn, R. S. & Gottesman, M. E., (2015).** Regulation of transcription elongation and termination. *Biomolecules*, 5(2), 1063-1078.
368. **Westers, H., Westers, L., Darmon, E., Van Dijl, J. M., Quax, W. J. & Zanen, G., (2006).** The CsrRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *The FEBS Journal*, 273(16), 3816-3827.
369. **Westers, L., Westers, H. & Quax, W. J., (2004).** *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 299-310.
370. **Winkler, U. K. & Stuckmann, M., (1979).** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 663-670.
371. **Winkler, W. C. & Breaker, R. R., (2005).** Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annual Review of Microbiology*, 59, 487-517.
372. **Wong, S.-L. & Doi, R. H., (1984).** Utilization of a *Bacillus subtilis* sigma 37 promoter by *Escherichia coli* RNA polymerase *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 259(15), 9762-9767.
373. **Woodcock, D., Crowther, P., Doherty, J., Jefferson, S., Decruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S., Michael, M. & Graham, M., (1989).** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17(9), 3469-3478.
374. **Wu, S.-C., Ye, R., Wu, X.-C., Ng, S.-C. & Wong, S.-L., (1998).** Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *Journal of Bacteriology*, 180(11), 2830-2835.
375. **Yamane, K., Bunai, K. & Kakeshita, H., (2004).** Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(10), 2007-2023.

376. Yamazaki, T., Yahagi, S.-I., Nakamura, K. & Yamane, K., (1999). Depletion of *Bacillus subtilis* histone-like protein, Hbsu, causes defective protein translocation and induces upregulation of small cytoplasmic RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(19), 211-214.
377. Yang, H., Qu, J., Zou, W., Shen, W. & Chen, X., (2021). An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18), 6607-6626.
378. Yang, T., Irene, K., Liu, H., Liu, S., Zhang, X., Xu, M. & Rao, Z., (2019). Enhanced extracellular gamma glutamyl transpeptidase production by overexpressing of PrsA lipoproteins and improving its mRNA stability in *Bacillus subtilis* and application in biosynthesis of L-theanine. *Journal of Biotechnology*, 302, 85-91.
379. Yao, S. & Bechhofer, D. H., (2010). Initiation of decay of *Bacillus subtilis* *rpsO* mRNA by endoribonuclease RNase Y. *Journal of Bacteriology*, 192(13), 3279-3286.
380. Yao, S., Blaustein, J. B. & Bechhofer, D. H., (2007). Processing of *Bacillus subtilis* small cytoplasmic RNA: evidence for an additional endonuclease cleavage site. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 4464-4473.
381. Yeom, S.-J., Kim, M., Kwon, K. K., Fu, Y., Rha, E., Park, S.-H., Lee, H., Kim, H., Lee, D.-H. & Kim, D.-M., (2018). A synthetic microbial biosensor for high-throughput screening of lactam biocatalysts. *Nature Communications*, 9, 5053.
382. Yin, H. & Marshall, D., (2012). Microfluidics for single cell analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(1), 110-119.
383. Young, C. L., Britton, Z. T. & Robinson, A. S., (2012). Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7(5), 620-634.
384. Youngman, E. M., McDonald, M. E. & Green, R., (2008). Peptide release on the ribosome: mechanism and implications for translational control. *Annual Review of Microbiology*, 62, 353-373.
385. Zalucki, Y. M., Beacham, I. R. & Jennings, M. P., (2009). Biased codon usage in signal peptides: a role in protein export. *Trends in Microbiology*, 17(4), 146-150.
386. Zalucki, Y. M. & Jennings, M. P., (2007). Experimental confirmation of a key role for non-optimal codons in protein export. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(1), 143-148.
387. Zhang, K., Su, L., Duan, X., Liu, L. & Wu, J., (2017). High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. *Microbial Cell Factories*, 16, 32.
388. Zhang, K., Su, L. & Wu, J., (2018a). Enhanced extracellular pullulanase production in *Bacillus subtilis* using protease-deficient strains and optimal feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5089-5103.
389. Zhang, K., Su, L. & Wu, J., (2020). Recent advances in recombinant protein production by *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 295-318.

-
390. **Zhang, N. & Buck, M., (2015).** A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. *Biomolecules*, 5(2), 1012-1019.
391. **Zhang, X., Sitasuwan, P., Horvath, G., Yang, J., Nie, Y., Marinova, M., Lee, L. A. & Wang, Q., (2018b).** Increased activity of β -glucuronidase variants produced by site-directed mutagenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 109, 20-24.
392. **Zyk, N., (1972).** Simple photometric assay of β -lactamase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(5), 356-359.

7 Anhang

7.1 Anhang zu Kapitel 3.1

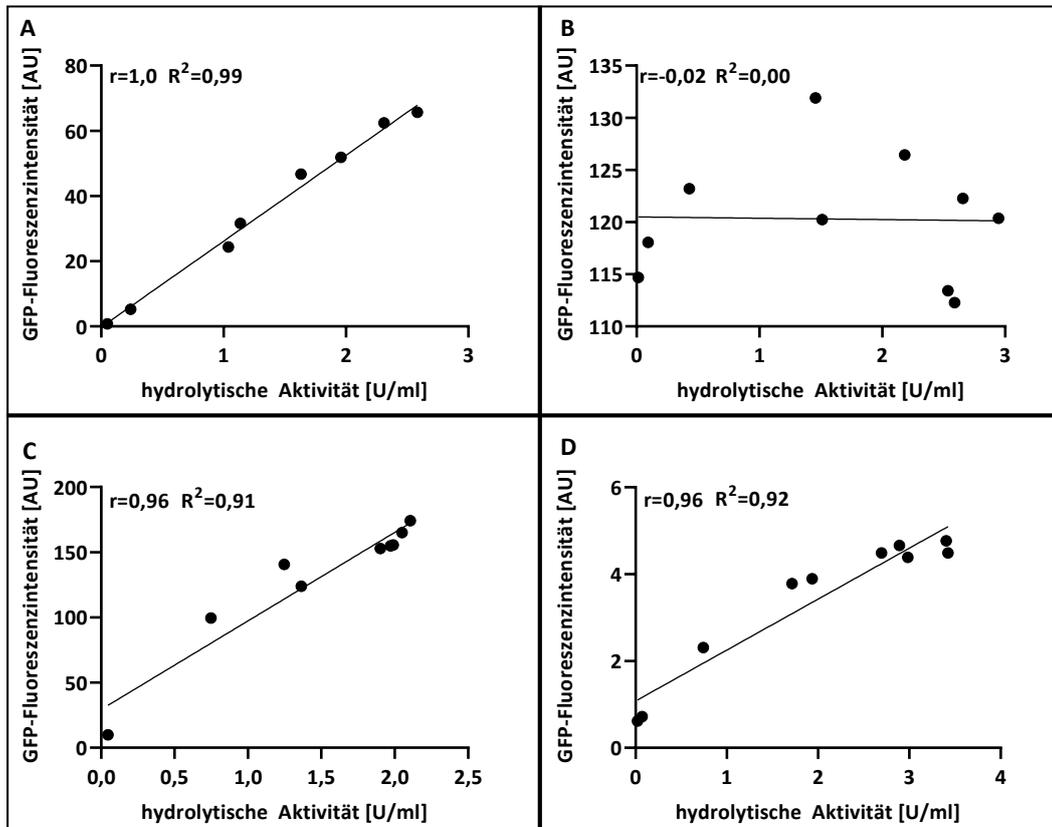


Abb. 7.1: Korrelationen zwischen gemessenen Fluoreszenzintensitäten und Aktivitäten aus Kapitel 3.1. Es wurden jeweils die gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen die Aktivitäten aufgetragen. Zusätzlich wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r ; Pearson, 1895) und die Regressionsgeraden (R^2) berechnet. **A** Korrelation zwischen gemessenen Fluoreszenzintensitäten des Split GFP Assays und den gemessenen hydrolytischen Aktivitäten der GUS11 aus Abb. 3.3. **B** Korrelation zwischen *sf*GFP-Fluoreszenzintensitäten und GUS11-Aktivitäten bei der Koproduktion beider Proteine in einem Zweiplasmidsystem aus Abb. 3.4. **C** Kontrolle der Korrelation zwischen *i*Split GFP-Fluoreszenz und GUS11-Aktivität aus Abb. 3.6. **D** Kontrolle der Korrelation zwischen im BioLector® Mikrobioreaktor gemessenen *i*Split GFP-Fluoreszenzintensitäten und dazugehörigen GUS11-Aktivitäten aus Abb. 3.7.

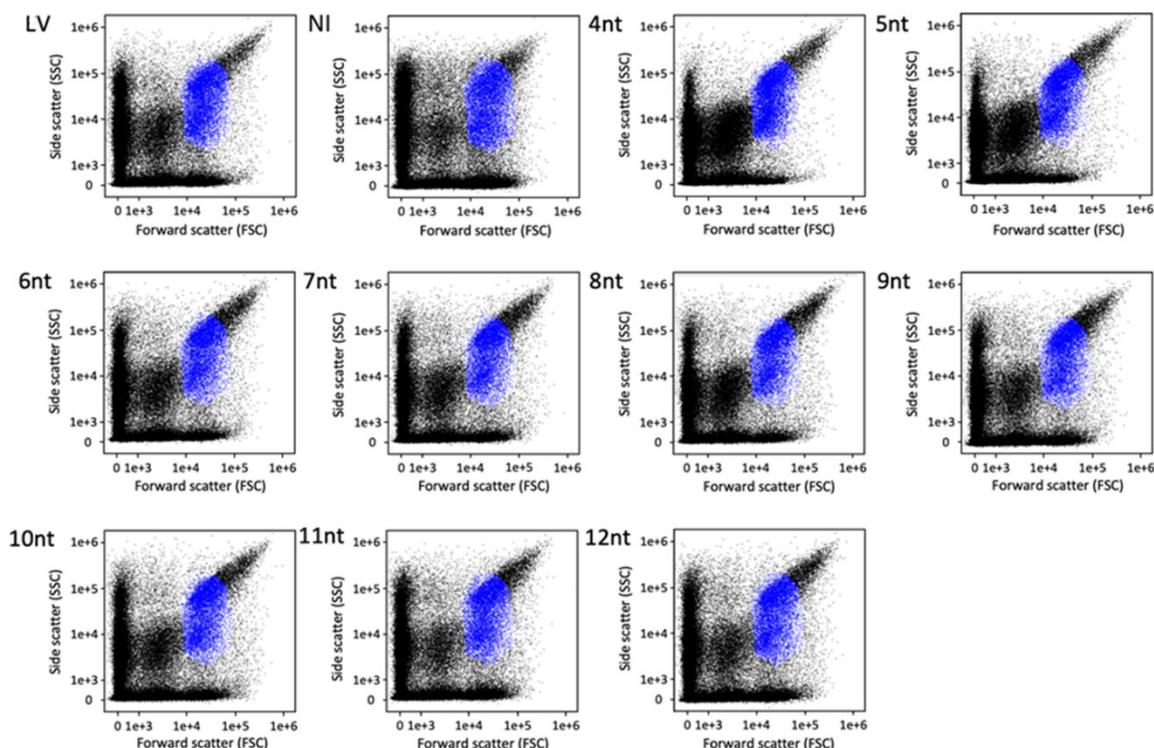


Abb. 7.2: In der Durchflusszytometrie gemessene Lichtbrechungseigenschaften von *B. subtilis* DB430-Doppeltransformatanten. Side scatter aufgetragen gegen forward scatter von *B. subtilis* DB430-Zellen transformiert mit der Plasmidserie pBS-Xnt-GUS11 und dem Plasmid pHT01-iSplitGFP (Detektor), zur Unterscheidung lebender Einzelzellen (hier in blau dargestellt) von Zelltrümmern und Zellaggregaten (hier in schwarz dargestellt). Die graduelle Expression der *gus11* wurde durch verschieden lange RBS-Spacer (von 4-12 nt, hier angezeigt als Xnt im Plasmidnamen) erzielt. Als Negativkontrollen diente der Leervektor pBSMul (LV) und nicht induzierte pBS-8nt-GUS11 Kulturen (NI). Die hier analysierten Zellen wurden für 24 Stunden bei 30°C und 1100 UpM in FlowerPlates® im BioLector® Mikrobioreaktorsystem kultiviert. Die Expression des Detektor-Gens wurde zu Beginn der Kultivierung mit 1 mM IPTG induziert. Alle hier abgebildeten Graphen sind repräsentative Beispiele von Dreifachbestimmungen. Modifiziert nach Lenz et al., 2021.

7.2 Anhang zu Kapitel 3.2

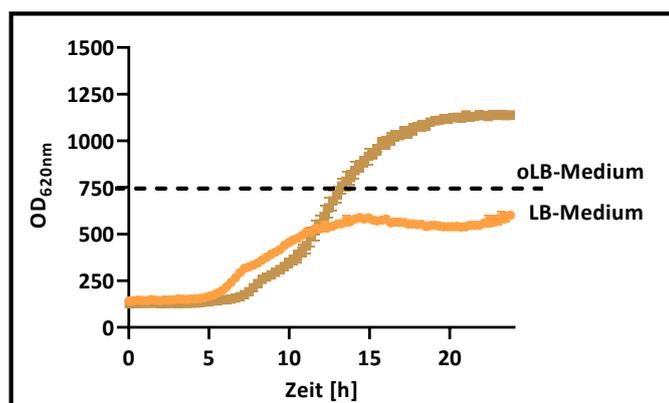


Abb. 7.3: *B. subtilis* Wuchsverhalten in unterschiedlichen Vollmedien. Für die hier dargestellten Wuchskurven wurden *B. subtilis* DB430, welche den pBSMul1 Leervektor trugen, im BioLector® Mikrobioreaktor bei 30°C und 1100 UpM entweder in LB-Medium oder in oLB-Medium kultiviert. Die Biomasse wurde alle 15 Minuten über die Lichtstreuung bei 620 nm bestimmt.

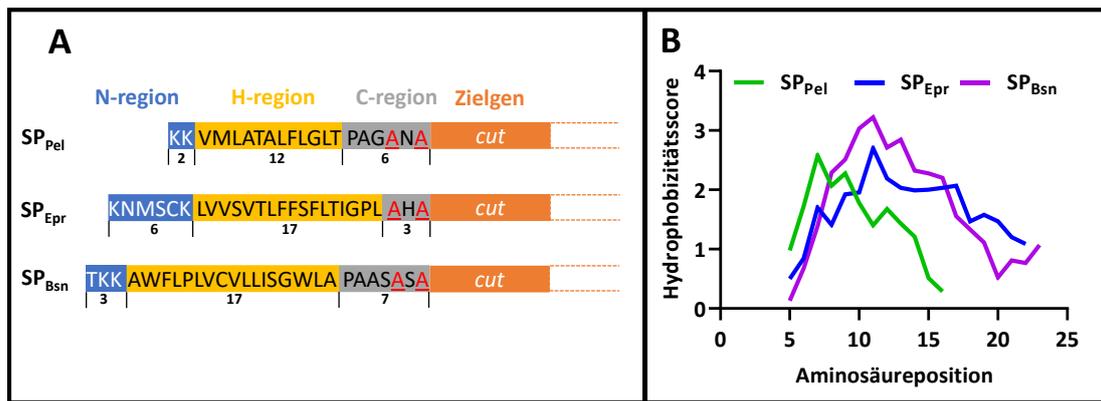


Abb. 7.4: Analyse der Signalpeptide SP_{Pel}, SP_{Bsn} und SP_{Epr}. **A** Schematische, nicht maßstabgetreue Darstellung mit Aminosäuresequenz der dreigeteilten Domänenstruktur der Signalpeptide der Proteine Pel (SP_{Pel}), Epr (SP_{Epr}) und Bsn (SP_{Bsn}) mit dem Cutinasegen (orange) am 3'-Ende der Signalpeptide. Mittels „SignalP 6.0“ (Teufel et al., 2021) wurde die Aufteilung in N-Region (blau), hydrophobe H-Region (gelb) und unpolare C-Region (grau) kalkuliert. Zusätzlich sind die Längen der einzelnen Regionen und die Signalpeptidaseerkenntnissequenz (Ala-X-Ala) in rot angegeben. **B** Hydrophobizitätsplots der ausgewählten Signalpeptide, welche mit „ProtScale“ unter Verwendung des *hydropathy scales* nach Kyte und Doolittle berechnet wurden (Gasteiger et al., 2005, Kyte et al., 1982).

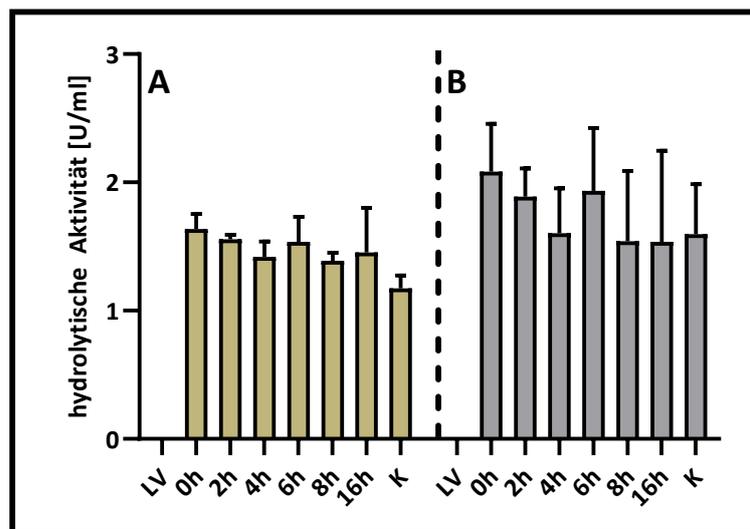


Abb. 7.5: Hydrolytische Aktivitäten der mittels SP_{Epr} sekretierten Cut11 bei der Etablierung des *in vivo* Split GFP Assays. Die hier dargestellten Aktivitäten, welche mit *pNPP* gemessen wurden, sind Endpunktbestimmungen zu den BioLector® Mikrobioreaktor Kultivierungen aus Kap 3.2.2 zur Etablierung des *in vivo* Split GFP Assays. Die Aktivitäten wurden auf eine OD_{580nm} von 1 normiert. Die mit dem Plasmid pBS-4nt4-SP_{Epr}-Cut11 oder dem Leervektor pBSMul1 (LV) transformierten *B. subtilis* PAL5 wurden für 24 Stunden in oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM kultiviert. **A** Beim ersten Schritt der *in vivo* Split GFP Assay Etablierung wurde den Kulturen zu gewissen Zeitpunkten (hier dargestellt durch Xh) GFP1-10 zugeführt. **B** im nächsten Schritt wurde das Kulturmedium zum Kultivierungsbeginn mit 1% (w/v) Glukose supplementiert, um die Expression des proteolytischen Netzwerks über CcpA zu inhibieren. Alle Messungen wurden in biologischen und technischen Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

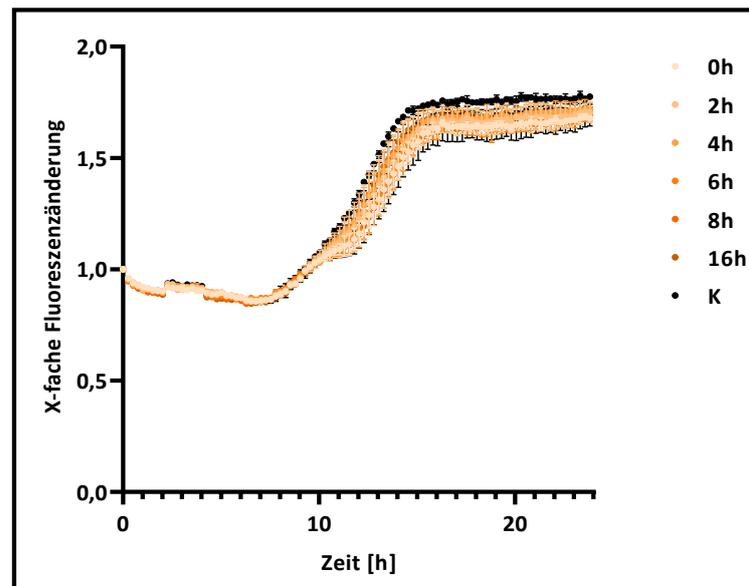


Abb. 7.6: Online Messung des Sekretionsstresses zu Abb. 3.13. Es wurde *B. subtilis* PAL5 mit dem Plasmid pBS-4nt-SP_{Epr}-Cut11 transformiert. Das Plasmid trägt einen 4 nt langen RBS-Spacer zwischen SD-Sequenz und Startcodon der *cut*. Zusätzlich wurde der *cut* am 3'-Ende die Sequenz des GFP11-tags angefügt. Die Transformanten wurden in einem BioLector® Mikrobioreaktorsystem für 24 Stunden in oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM in einer FlowerPlate® kultiviert. Der Sekretionsstress wurde während der Kultivierung alle 15 Minuten über die mCherry-Fluoreszenz ausgelesen. Die gemessenen Fluoreszenzen wurden auf den Startwert normiert. Das GFP11-10 Detektorprotein wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung dem Medium zugegeben. Als Negativkontrolle diente eine Variante ohne Detektor (K). Die Kultivierungen wurden in biologischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

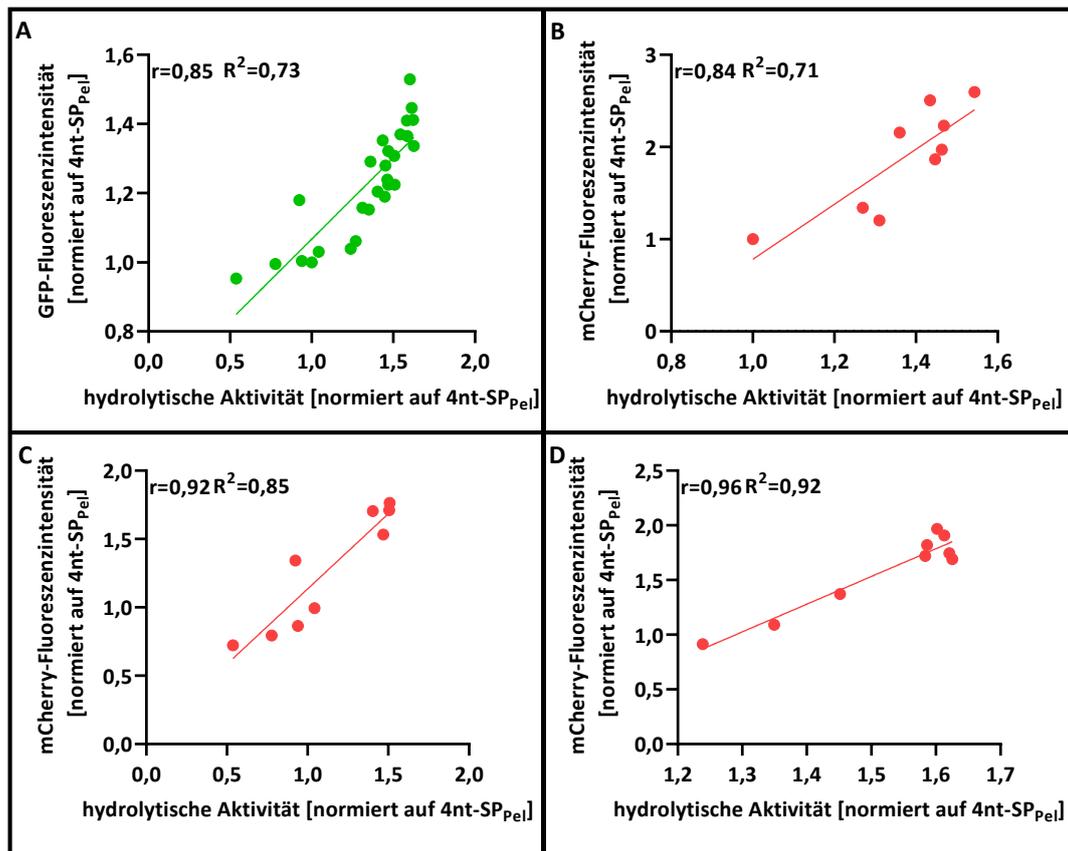


Abb. 7.7: Korrelationsanalysen des kombinierten Nachweissystems für sekretierte Zielproteine in *B. subtilis* anhand der Cut11-Sekretion mit drei verschiedene Signalpeptiden und variierenden RBS-Spacern. Für die Analysen wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen die Aktivitäten aus Abb. 3.17 aufgetragen. Zusätzlich wurden die Korrelationen nach Pearson (r ; Pearson, 1895) und die Regressionsgeraden (R^2) bestimmt. **A** Analyse der Korrelation zwischen allen gemessenen Aktivitäten und *in vivo* Split GFP-Fluoreszenzintensitäten. Korrelationsanalyse für die gemessenen Aktivitäten und mCherry-Fluoreszenzintensitäten, welche die zelluläre Stressantwort repräsentieren, **B** der SP_{peI}-Varianten, **C** SP_{Epr}-Varianten und **D** SP_{Bst}-Varianten.

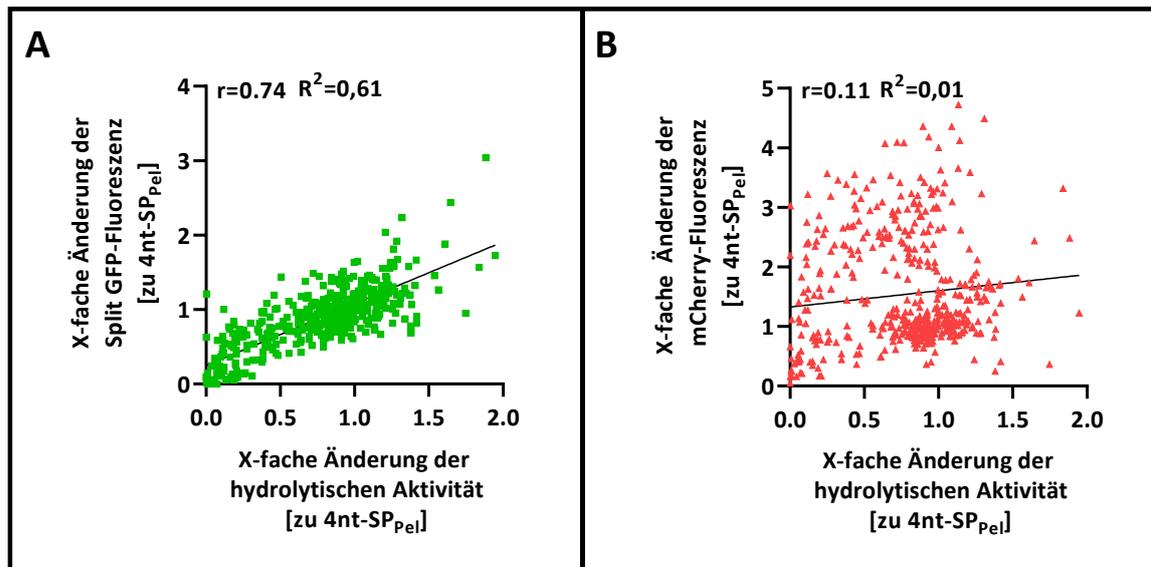


Abb. 7.8: Korrelationsanalyse des kombinierten Nachweissystems für sekretierte Zielproteine in *B. subtilis* anhand eines Signalpeptid-Screenings für die Cut11. Für die Analyse wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen die Aktivitäten aus Abb. 3.18 aufgetragen. Zusätzlich wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r ; Pearson, 1895) und die Regressionsgerade (R^2) berechnet. **A** Korrelationsanalyse für den *in vivo* Split GFP Assays. **B** Korrelationsanalyse für den durch die Cut11-Sekretion verursachten Sekretionsstress.

7.3 Anhang zu Kapitel 3.3

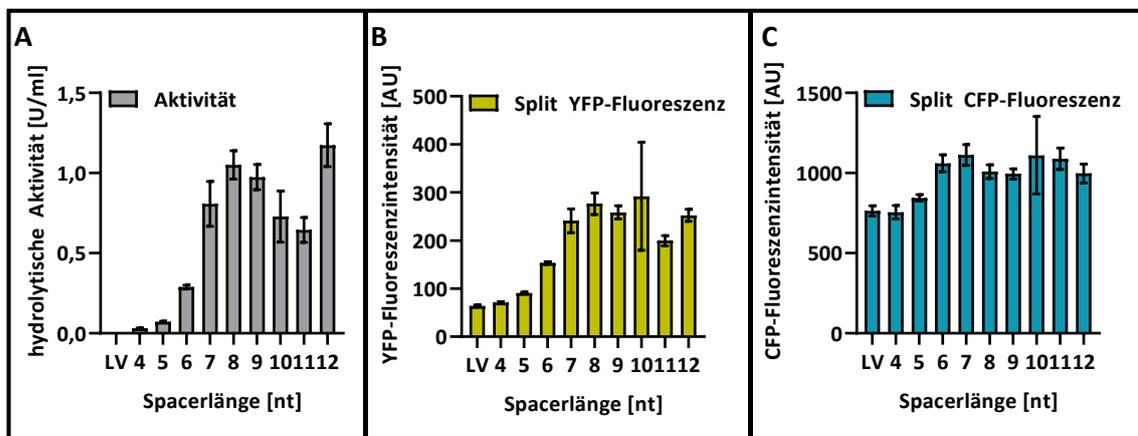


Abb. 7.9: Nachweis extrazellulärer Cut11 über die hydrolytische Aktivität und den Split FP Assay mit cyan und gelb fluoreszierenden Detektorvarianten. **A** Hydrolytische Cut11-Aktivitäten im zellfreien Kulturüberstand mit *pNPP* gemessen. Zusätzlich wurde die Cut11 mit dem Split FP Assay unter Nutzung eines **A** YFP- oder **B** CFP-Detektors über die holo-Fluoreszenzreporterintensität detektiert. Zur Gewinnung der Daten wurde *B. subtilis* DB430 mit einem Plasmid der Plasmidserie pBS-Xnt-SP_{NprE}-Cut11 transformiert. Bei der Plasmidserie pBS-Xnt-SP_{NprE}-Cut11 wurde für die Nutzung des Split GFP-basierten Nachweises die DNA-Sequenz des GFP11-*tags* an das 3'-Ende der *cut* fusioniert. Die Sekretion der Cut11 wird durch das Signalpeptid der Protease NprE vermittelt. Zusätzlich werden RBS-Spacer von 4 bis 12 nt (im Namen der Plasmidserie dargestellt durch Xnt) zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon der *cut11* verwendet. Die Transformanten wurden für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM kultiviert. Hydrolytische Aktivitäten und Fluoreszenzintensitäten wurde auf eine OD_{580nm} von 1 normiert. Die Messungen wurden in biologischen und technischen Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mittelwerte mit den Standardabweichungen der biologischen Triplikate.

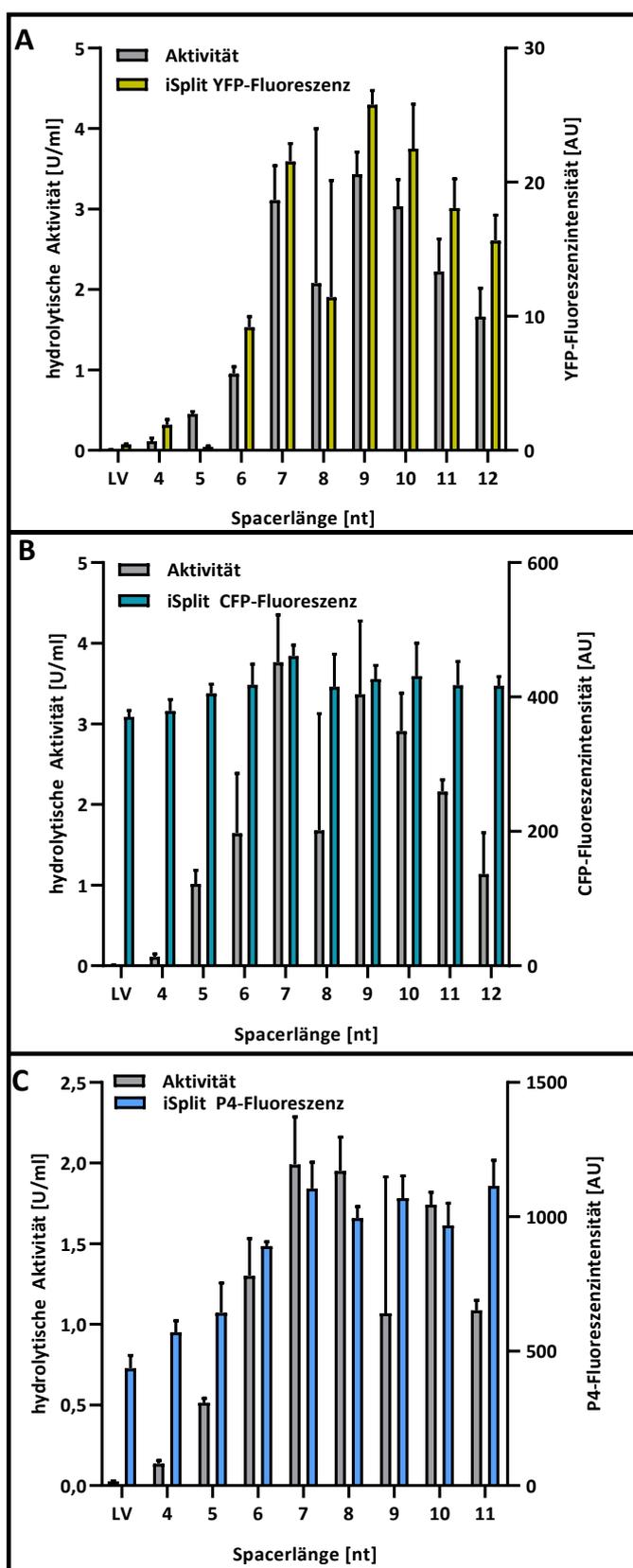


Abb. 7.10: Nachweis intrazellulärer GUS11 über die hydrolytische Aktivität und dem iSplit FP Assay mit cyan, gelb und blau fluoreszierenden Detektorvarianten.

Jeweilige hydrolytische Aktivitäten im Zellysate der GUS11-Varianten mit *pNPG* (grau) und die dazugehörigen **A** YFP-Fluoreszenz-intensitäten (gelb), **B** CFP-Fluoreszenz-intensitäten (türkis) oder **C** P4-Fluoreszenzintensitäten (blau), welche durch Nutzung des iSplit FP Assays in lebenden Zellen gemessen wurden. Zur Gewinnung der Daten wurde *B. subtilis* DB430 mit einem Plasmid der Plasmidserie *pBS-Xnt-GUS11* und einem der Detektorplasmide *pHT01-iSplitYFP* (**A**), *pHT01-iSplitCFP* (**B**) oder *pHT01-iSplitP4* (**C**) transformiert. Bei der Plasmidserie *pBS-Xnt-GUS11* wurde für die Nutzung des Split FP-basierten Nachweises die DNA-Sequenz des *GFP11-tags* an das 3'-Ende der *gus* fusioniert. Zusätzlich wurden RBS-Spacer von 4 bis 12 nt (bei **C** bis 11 nt) zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon der *gus11* verwendet (im Namen der Plasmidserie dargestellt durch Xnt). Die Transformanten wurden für 24 Stunden in 1 ml oLB-Medium bei 30°C und 1100 UpM kultiviert. Für die Induktion der Expression des Detektorgens wurde das Medium zusätzlich mit 1 mM IPTG versetzt. Hydrolytische Aktivitäten und Fluoreszenzintensitäten wurden auf eine OD_{580nm} von 1 normiert. Die Messungen wurden in biologischen und technischen Triplikaten durchgeführt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der biologischen Triplikate.

8 Anteilerklärung an veröffentlichten Werken

Anteile des Doktoranden **Patrick Lenz** an den, in dieser Arbeit als Ergebnisse aufgeführten Daten aus der folgenden Veröffentlichung:

„The iSplit GFP assay detects intracellular recombinant proteins in *Bacillus subtilis*“ **Patrick Lenz**, Fabienne Hilgers, Alina Burmeister, Leonie Zimmermann, Kristina Volkenborn, Alexander Grünberger, Dietrich Kohlheyer, Thomas Drepper, Karl-Erich Jaeger, Andreas Knapp (2021), *Microb Cell Fact* 20, 174 (2021), <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01663-7>

Patrick Lenz	Planung, Durchführung und Analyse der Experimente in Zellsuspensionen, Analyse der mikrofluidischen Bilder und Anfertigung des Manuskriptes
Fabienne Hilgers	Planung und Durchführung der Durchflusszytometeranalyse
Alina Burmeister	Planung und Durchführung der mikrofluidischen Kultivierung;
Leonie Zimmermann	Klonierungsexperimente
Kristina Volkenborn	Klonierungsexperimente
Alexander Grünberger	Planung und Durchführung der mikrofluidischen Kultivierung; Zur Verfügungstellung der Technologie für die mikrofluidische Kultivierung
Dietrich Kohlheyer	Zur Verfügungstellung der Technologie für die mikrofluidische Kultivierung
Thomas Drepper	Planung, Koordination und Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes
Karl-Erich Jaeger	Planung, Koordination und Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes
Andreas Knapp	Planung, Koordination und Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes