

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobiologie

**Charakterisierung von Mutanten
im Lösungsmittelstoffwechsel von
*Clostridium acetobutylicum***

Daniel Hönicke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. Grill

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

2. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Die Dissertation wurde am 09.04.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.06.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	2
1.2 Stoffwechsel von <i>C. acetobutylicum</i>	4
1.3 Metabolic Engineering	6
1.4 Zielsetzung der Arbeit	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Enzyme, Chemikalien und Geräte	11
2.2 Organismen und Plasmide	12
2.3 Nährmedien	14
2.3.1 Medium für <i>E. coli</i>	14
2.3.2 Medien für <i>C. acetobutylicum</i>	15
2.3.3 Medienzusätze	17
2.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle	18
2.5 Zellanzucht	19
2.5.1 Zellanzucht von <i>E. coli</i>	19
2.5.2 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i> auf Festmedium	19
2.5.3 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i> in Batch-Kultur.....	19
2.5.4 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i> in Kontinuierlicher Kultur	20
2.6 Bestimmung der physiologischen Parameter	22
2.6.1 Optische Dichte	22
2.6.2 Berechnung des Wachstums.....	22
2.6.3 Gaschromatische Bestimmung des Produktspektrums	22
2.6.4 Bestimmung der Glukosekonzentration	23
2.6.5 Bestimmung der Laktatkonzentration	24

2.6.6	Bestimmung der Riboflavinkonzentration	25
2.7	Arbeiten mit Nucleinsäuren.....	26
2.7.1	Vorbehandlung von Lösungen und Geräten.....	26
2.7.2	Isolierung von Nucleinsäuren	26
2.7.3	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	31
2.7.4	Fällung und Reinigung von Nucleinsäuren.....	31
2.7.5	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.7.6	Enzymatische Modifikation von DNA.....	34
2.7.7	DNA-Sequenzierung	36
2.7.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.7.9	DNA-DNA Hybridisierung mittels Southern Blot.....	42
2.8	Erzeugung rekombinanter Organismen	45
2.8.1	DNA Transfer in <i>E. coli</i>	45
2.8.2	DNA Transfer in <i>C. acetobutylicum</i>	46
2.9	ClosTron Gene Knockout System	47
2.9.1	Erzeugung genspezifischer pMTL007C-E2 Vektoren.....	47
2.9.2	Transformation der ClosTron Plasmide in <i>E. coli</i>	48
2.9.3	Transformation der ClosTron Plasmide in <i>C. acetobutylicum</i>	48
2.9.4	Nachweis der Insertion.....	49
2.10	Hybridisierung und Auswertung von DNA-Microarrays	51
2.10.1	Markierung von RNA mit Cy3/Cy5 Fluoreszenzfarbstoffen.....	51
2.10.2	Hybridisierung der <i>probes</i> mit markierter <i>target</i> -cDNA	53
2.10.3	Quantifizierung der Microarray-Daten.....	54
2.10.4	Analyse der Transkriptionsdaten.....	55
3.	Ergebnisse	56
3.1	„ClosTron Gene Knockout System“	56
3.2	Analyse des Acetat- und Aceton-Stoffwechsels.....	57
3.2.1	Kontinuierliche Kultivierung der <i>C. acetobutylicum</i> -Stämme.....	58

3.2.2	Transkriptomanalyse	63
3.3	Analyse von Integrationsmutanten des C ₄ -Stoffwechsels	71
3.3.1	Physiologische Charakterisierung der ClosTron-Mutanten	72
3.3.2	Transkriptomanalyse	81
3.4	Untersuchung der Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2	93
3.4.1	Charakterisierung der <i>adhE2</i> -Integrationsmutante	93
3.4.2	Transkriptionsanalysen von <i>C. acetobutylicum adhE2::int(696)</i>	95
3.5	Untersuchung der Pyruvat-Formiat-Lyase	98
3.5.1	ClosTron-basierte Inaktivierung der Gene CAC0980 und CAC0981	98
3.5.2	Charakterisierung der Integranden <i>pflA::int(60)</i> und <i>pflB::int(1335)</i>	101
3.5.3	Experimente zur Komplementierung der Mutationen.....	103
3.5.4	Transkriptomanalyse	108
3.5.5	Verifizierung ausgewählter Daten der Transkriptionsanalysen durch <i>real-time</i> RT-PCR.....	112
3.6	Untersuchung der Pyruvat-Decarboxylase	113
3.6.1	Konstruktion einer <i>C. acetobutylicum pdc::int(843)</i> Integrande.....	114
3.6.2	Charakterisierung der Pyruvat-Decarboxylase-Integrationsmutante	116
3.6.3	Transkriptionsanalysen von <i>C. acetobutylicum pdc::int(843)</i>	118
4.	Diskussion	121
4.1	Manipulation des Säure- und Aceton-Stoffwechsels.....	122
4.1.1	Einfluss der Mutationen auf den Gärungsstoffwechsel.....	122
4.1.2	Säure-Reassimilation.....	130
4.1.3	DNA-Microarray-Analysen.....	132
4.2	Butyrat-/Butanol-negativer Stamm.....	137
4.2.1	Einfluss der Hbd-Inaktivierung auf die Redoxhomöostase.....	138
4.2.2	AdhE2 verantwortlich für die Ethanolproduktion?	140
4.3	Oxidative Verwertung von Pyruvat	144
4.3.1	Pyruvat-Formiat-Lyase.....	145

4.3.2	Pyruvat-Decarboxylase	151
5.	Zusammenfassung	156
5.	Summary	158
6.	Publikationen.....	160
7.	Literaturverzeichnis.....	161
8.	Anhang	187
9.	Danksagung	218
10.	Lebenslauf	220

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A.	Aqua
aa	„aminoacid“
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
asRNA	„antisense“-RNA
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure („complementary“)
CGM	„Clostridia Growth Medium“
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und weitere (et alteri)
Ed.	Editor
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
Ery	Erythromycin
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
GC	Gaschromatographie

x g	Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m s}^{-2}$ (bei Zentrifugen)
h	Stunde
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen
L	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli- (10^{-3})
M	Molar (mol L^{-1})
μ	Mikro- (10^{-6}), Wachstumsrate
MCS	Multiklonierungsstelle („multiple cloning site“)
min	Minute
min^{-1}	Umdrehungen pro Minute
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MS	mineral salt
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MV	Methylviologen
n	Nano- (10^{-9})
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
OD_x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffprotonenkonzentration
P_i	anorganisches Phosphat
PTS	Phosphotransferase-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOE	Splicing with overlap extensions
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TiCl ₃	Titan(III)-chlorid
T _m	Schmelztemperatur („melting temperature“)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Bei *Clostridium* handelt es sich um eine der insgesamt 34 Gattungen der Familie *Clostridiaceae* mit auffallender phänotypischer und genotypischer Diversität (Hippe *et al.*, 1992). Der Genus *Clostridium* ist gekennzeichnet durch den Besitz einer Gram-positiven Zellwand, einem obligat anaeroben Energiestoffwechsel, der Unfähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion und der Fähigkeit zur Ausbildung hitzeresistenter Endosporen (Rogers, 1999). Letzteres Kriterium ermöglicht eine ubiquitäre Lebensweise, weshalb Abwässer, Schlämme, Sedimente, verschiedene Böden sowie der Intestinaltrakt des Menschen und höherer Tiere zu den natürlichen Habitats gehören. Mit Hilfe von 16S rRNA-Sequenzanalysen konnten die Mikroorganismen dieser heterogenen Gruppe nach phylogenetischen Aspekten klassifiziert und die etwa 200 Spezies und Subspezies in 19 Cluster eingeteilt werden (Collins *et al.*, 1994). In Abhängigkeit der bevorzugten Energie- und Kohlenstoffquelle wurden die Clostridien in folgende Gruppen unterteilt: proteolytische und/oder saccharolytische Clostridien sowie Spezialisten (Hippe *et al.*, 1992). Zur proteolytischen Gruppe gehören einige pathogene Arten, die sich durch die Fähigkeit zur Synthese von hochwirksamen Exotoxinen auszeichnen. Hierzu gehören z.B. *C. tetani*, der Erreger des Wundstarrkrampfes (Tetanus), *C. botulinum*, Verursacher meist letal verlaufender Lebensmittelintoxikationen (Botulismus) sowie *C. perfringens*, der Erreger einer mit Gasbildung einhergehenden nekrotisierenden Infektion der Weichteile (Gasbrand). Die proteolytischen Vertreter sind durch Sekretion von Proteasen auf die Verwertung von Proteinen spezialisiert, wobei hauptsächlich einzelne Aminosäuren oder verschiedene Gruppen von Aminosäuren vergoren werden (Mead, 1971). Saccharolytische Clostridien vergären Mono- und Disaccharide wie z.B. Glukose, Fruktose, Laktose, Xylose, Saccharose und Mannitol, wobei organische Säuren, Lösungsmittel sowie Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid gebildet werden (Mitchell, 1992). Somit besitzen die Vertreter dieser Gruppe ein hohes Potential für biologisch-technische Anwendungen. Neben Acetoin und Buttersäure, denen eine Bedeutung als Geschmacks- und Aromastoffe in der Lebensmitteltechnologie zukommt (Andersch *et al.*, 1982; Bunday Z. *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 2002), ist vor allem die Produktion von Butanol als vielversprechender Biotreibstoff von großem Interesse (Lee *et al.*, 2008b; Noack S. *et al.*, 2009). Bis heute stellt die sogenannte Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation durch solventogene Clostridien das zweitgrößte biotechnologische Produktionsverfahren dar (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Als Modellorganismus gilt dabei der Stamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Papoutsakis, 2008).

1.1 *Clostridium acetobutylicum*

Bereits 1861 berichtete Luis Pasteur an der Academie Francaise von einer, „auf kleinen Tieren, die in Abwesenheit von Sauerstoff leben“ beruhenden, Bildung von Butanol (Pasteur, 1861a; Pasteur, 1861b). Diese Beobachtung und seine Schlussfolgerung „Fermentation, c'est la vie sans air“ (Pasteur, 1862) gelten heute als Ursprung wissenschaftlicher Mikrobiologie (Schwartz, 2001; Wolfe, 1999). Später beschrieb auch Schardinger 1904 eine mikrobielle Produktion von Butanol und Aceton (Schardinger, 1904), eine Eigenschaft, die Anfang des 20. Jahrhunderts, aufgrund des aufkommenden Mangels an natürlichem Gummi (Naturkautschuk), von großem Interesse wurde. Die englische Firma Strange and Graham Ltd. startete 1910 ein Projekt zur industriellen Herstellung von synthetischem Gummi und gewann dafür u.a. den Wissenschaftler Chaim Weizmann, der den meisten Menschen weniger als Chemiker, sondern eher als einer der Gründerväter und ersten Präsidenten des Staates Israel bekannt ist. Die Herstellung des synthetischen Kautschuks sollte über Butadien und Isopren erfolgen, wobei Butanol und Aceton die Ausgangsstoffe darstellen (Gabriel, 1928). So begann die Erforschung der mikrobiellen Fermentation dieser Vorstufen. Zwischen 1912 und 1914 konnte durch Weizmann ein Butanol- und Aceton-bildender Stamm isoliert werden, der von ihm als „BY“ bezeichnet wurde (Killeffer, 1927). Erst im Jahre 1926 erhielt er seinen heutigen Namen *C. acetobutylicum* (McCoy *et al.*, 1926).

Bei *C. acetobutylicum* handelt es sich um Gram-positives, stäbchenförmiges, strikt anaerobes, Endosporen bildendes Eubakterium aus der Familie der *Firmicutes*. Es gehört in die Gruppe peritrich begeißelter und amylytisch aktiver Clostridien, besitzt einen niedrigen G+C-Gehalt (31 %) und zeichnet sich durch einen biphasischen Gärungsstoffwechsel aus, der mit einem komplexen Zellzyklus verbunden ist (Abbildung 1.1). Die erste Phase, die sogenannte Säurephase („Acidogenese“), findet während des exponentiellen Wachstums statt (Andersch *et al.*, 1983; Hartmanis & Gatenbeck, 1984). Neben molekularem Wasserstoff (H₂) und Kohlendioxid (CO₂) werden primär die organischen Säuren Acetat und Butyrat produziert. Unter bestimmten Bedingungen können zudem geringe Mengen an Laktat gebildet werden (Jones & Woods, 1986). Besonders kennzeichnend für *C. acetobutylicum* ist die Fähigkeit, diverse Kohlenhydrate als Ausgangsstoffe nutzen zu können. So erstreckt sich das Substratspektrum über Pentosen und Hexosen zu Oligosacchariden und Polysacchariden (Grimmler *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008b; Lütke-Eversloh & Bahl, 2011; Servinsky *et al.*, 2010). Durch die Ausscheidung der Stoffwechselprodukte kommt es zu einer Ansäuerung des extrazellulären Milieus und zu einer Anreicherung undissoziierter Säuren. Im Zusammenhang mit dem dadurch bedingten Absinken des pH-Wertes im Medium und weiterer im Detail

unbekannt Faktoren kommt es beim Übergang zur stationären Wachstumsphase zu einer Umstellung des Stoffwechsels, dem sogenannten „Lösungsmittelshift“. Der Wechsel des Metabolismus von der Säure- zur Lösungsmittelproduktion erfolgt, um einer Zerstörung des essentiellen Protonengradienten an der Membran entgegenzuwirken (Paredes *et al.*, 2005). Neben pH-Wert und Konzentration organischer Säuren zählen auch die Limitierung von Nährstoffen wie z.B. Phosphat oder Schwefel bei gleichzeitigem Überschuss an Kohlenstoffquellen wie z.B. Glukose, interne ADP/ATP- bzw. NAD^+/NADH -Verhältnisse sowie die Anwesenheit von Butyrat im Medium zu den auslösenden Faktoren (Bahl *et al.*, 1982a; Bahl & Gottschalk, 1984; Bowles & Ellefson, 1985; Gottschal & Morris, 1981; Grupe & Gottschalk, 1992; Holt *et al.*, 1984; Hüsemann & Papoutsakis, 1986; Jewell *et al.*, 1986; Monot *et al.*, 1982; Terracciano & Kashket, 1986). Jedoch konnte keinem der genannten Parameter eine alleinige Schlüsselrolle zugeordnet werden. Der "Lösungsmittelshift" wird offensichtlich durch die Kombination mehrerer Faktoren hervorgerufen, wobei die genauen Regulationsmechanismen noch weitestgehend unbekannt sind (Dürre *et al.*, 1995; Ullmann *et al.*, 1996). In der zweiten Phase, der Lösungsmittelphase („Solventogenese“), werden die vorhandenen Säuren zum Teil wieder aufgenommen und zusammen mit dem verbliebenen Substrat zu den neutralen Lösungsmitteln Aceton, Butanol und Ethanol, typischerweise in einem molekularem Verhältnis von 3:6:1, umgesetzt (Lee *et al.*, 2012; Mitchell, 1998). Weiterhin geht die Lösungsmittelbildung mit einer Reihe verschiedener morphologischer Veränderungen der Zellform von *C. acetobutylicum* einher (Jones *et al.*, 1982). Aus den vegetativen Stäbchen entwickeln sich durch Differenzierungsprozesse zigarrenförmige, Granulose akkumulierende Zellen, die sogenannten „clostridial stages“ (Abbildung 1.1). Unter Nutzung der Granulose als Energie- und Kohlenstoffquelle kommt es zur Initiation des Sporulationsprozesses und damit zur Bildung von Vorsporen, die sich später zu Endosporen ausdifferenzieren (Long *et al.*, 1984; Reysenbach *et al.*, 1986). Die Sporen zeigen ausgeprägte Resistenzen gegenüber ungünstigen Umwelteinflüssen und können somit lange Zeit überdauern, bevor sie unter vorteilhaften Bedingungen erneut zu vegetativen Zellen auskeimen und sich so der Zellzyklus schließt (Jones & Woods, 1986; Jones *et al.*, 2008; Paredes *et al.*, 2005). Die genauen Signale, die zum Beginn des Sporulationsprozesses führen, sind bisher weitestgehend unbekannt. Durch die Initiierung der Sporulation wird jedoch das Überleben des Organismus gesichert, da die organischen Lösungsmittel ab einer bestimmten Konzentration toxisch für die Zelle sind (Baer *et al.*, 1987; Baer *et al.*, 1989; Dürre *et al.*, 2002; Harold, 1970; Ingram, 1976; Isken & de Bont, 1998; Moreira *et al.*, 1981; Ounine *et al.*, 1985; Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984). So gehen 7-13 g/l Butanol mit einer 50%igen und 12-

16 g/l mit einer völligen Wachstumshemmung einher. Bei Aceton und Ethanol führen erst höhere Konzentrationen von 70 g/l Aceton beziehungsweise 50 - 60 g/l Ethanol zu einer kompletten Wachstumshemmung (Jones & Woods, 1986). Durch die Umstellung des Stoffwechsels auf die Produktion von Lösungsmitteln gewinnt der Organismus Zeit, die Sporenbildung einzuleiten und somit das Überleben der Zelle zu sichern.

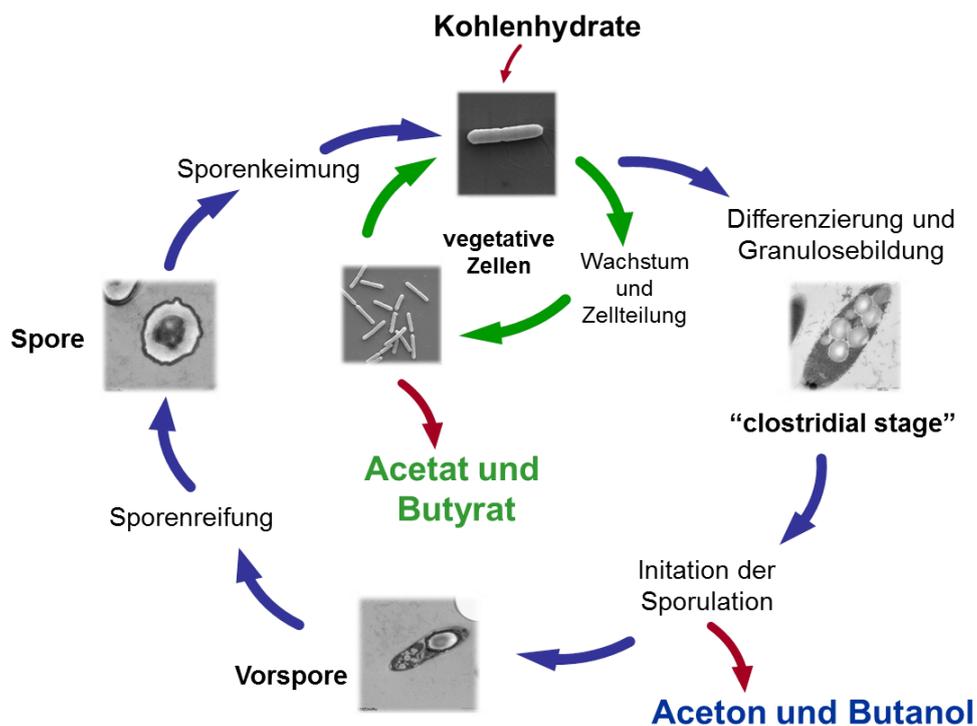


Abbildung 1.1: Zellzyklus mit den charakteristischen Endprodukten des biphasischen Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* (Janssen, 2010). Erläuterung siehe Text.

1.2 Stoffwechsel von *C. acetobutylicum*

In der Abbildung 1.2 ist der biphasische Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* am Beispiel der Metabolisierung von Glukose graphisch zusammengefasst. Die über ein Phosphotransferasesystem (PTS) in die Zelle aufgenommene Glukose (Tangney & Mitchell, 2007) wird über den Embden-Myerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) basierend auf der Substratketten-Phosphorylierung zu Pyruvat konvertiert. Dabei werden unter Bildung von 2 mol ATP und 2 mol NADH + 2 mol H⁺ 1 mol Glukose zu 2 mol Pyruvat umgesetzt. Neben einer möglichen Reduktion des Pyruvats zu 2 mol Laktat durch die L-Laktat-Dehydrogenase (L-Ldh) konnten in *C. acetobutylicum* 3 Enzyme zur oxidativen Verwertung identifiziert werden. Die Umwandlung zu 2 mol Acetyl-CoA und CO₂ durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pfor) gilt dabei als Hauptabbauweg (Meinecke *et al.*, 1989). Dieses Enzym

ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Redoxbalance, da die resultierenden Elektronen in Form von reduziertem Ferredoxin vorliegen. Mit Hilfe der Sauerstoff-sensitiven [FeFe]-Hydrogenase HydA wird das reduzierte Ferredoxin wieder in den oxidativen Zustand überführt und die Elektronen in Form von molekularem Wasserstoff (H_2) in das Außenmedium abgegeben. Dies gewährleistet eine fortlaufende Acidogenese und dadurch die Gewinnung der für das Wachstum benötigten Energie in Form von ATP (Amador-Noguez *et al.*, 2011; Jones & Woods, 1986). Einen weiteren Weg, Pyruvat oxidativ zu verwerten stellt die Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) dar. Sie katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu CO_2 und Acetaldehyd, welches durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase und/oder Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2) zu Ethanol reduziert wird. Eine dritte Möglichkeit könnte in der reversiblen, Coenzym-A (CoA) abhängigen Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (Pfl) bestehen. In der Säurephase wird das energiereiche Intermediärprodukt Acetyl-CoA entweder durch die Phosphotransacetylase (Pta) und die Acetat-Kinase (Ack) zu 2 mol Acetat umgesetzt, wobei ATP generiert wird, oder zwei Moleküle Acetyl-CoA werden mit Hilfe der Thiolase (Thl) zu 1 mol Acetoacetyl-CoA kondensiert. Das gebildete Acetoacetyl-CoA wird anschließend über 3-Hydroxybutyryl-CoA und Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA umgesetzt, dem Schlüsselintermediat zur Synthese von Butyrat aber auch Butanol (Walter *et al.*, 1993). Die Umwandlung von Butyryl-CoA zu Butyrat dient der Erzeugung von ATP und wird durch die Phosphotransbutyrylase (Ptb) und die Butyrat-Kinase (Buk) katalysiert. Unter natürlichen Bedingungen bildet *C. acetobutylicum* die Säuren Acetat und Butyrat in einem Molaren Verhältnis von 1:1,5, woraus sich eine Nettobildung von 3,3 mol ATP pro mol Glukose ergibt (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011; Rogers, 1984; Thauer *et al.*, 1977). Im Zuge des „metabolic shifts“ von der Acidogenese zur Solventogenese wird mit Hilfe der CoA-Transferase (CtfA/B) ein Teil der Säuren aus dem Medium wieder aufgenommen, wobei Acetyl- bzw. Butyryl-CoA und Acetoacetat gebildet werden. Die CoA-Derivate werden unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten ($NADH + H^+$) zu Butanol, dem Hauptfermentationsprodukt von *C. acetobutylicum*, und Ethanol reduziert. Da durch die Synthese dieser beiden organischen Lösungsmittel mehr Redoxäquivalente verbraucht werden, kommt es zu einer Verringerung der H_2 -Produktion. Acetoacetat wird in einer exergonen Reaktion durch die Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) zu Aceton decarboxyliert (Zheng *et al.*, 2009).

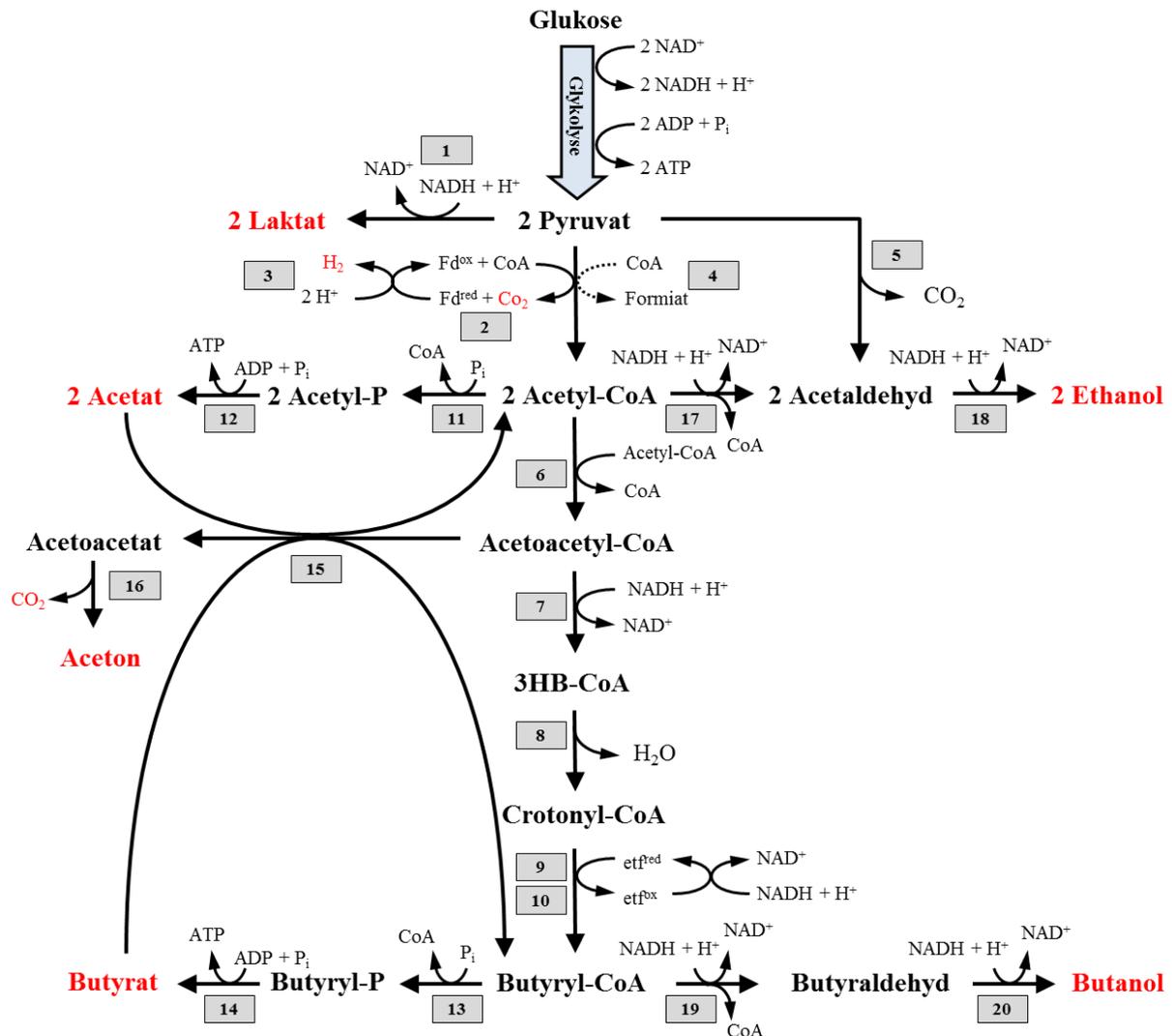


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum*. **1.** L-Laktat-Dehydrogenase (Ldh); **2.** Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR); **3.** Hydrogenase (HydA); **4.** Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL); **5.** Pyruvat-Decarboxylase (Pdc); **6.** Thiolase (Thl); **7.** 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd); **8.** Crotonase (Crt); **9.** Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd); **10.** Elektronen-übertragende Flavoproteine (EtfA/EtfB); **11.** Phosphotransacetylase (Pta); **12.** Acetat-Kinase (Ack); **13.** Phosphotransbutyrylase (Ptb); **14.** Butyrat-Kinase (Buk); **15.** CoA-Transferase A/B; **16.** Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) **17.** Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); **18.** Acetaldehyd-Dehydrogenase, Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); **19.** Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); **20.** Butanol-Dehydrogenase (BdhA, BdhB). 3HB-CoA: 3-Hydroxybutyryl-CoA. Erläuterungen siehe Text.

1.3 Metabolic Engineering

Die Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation wurde bis in die 50er Jahre hinein industriell in biotechnologischen Verfahren eingesetzt und stellte, bezogen auf das produzierte Gesamtvolumen, den zweitgrößten bakteriellen Prozess nach der Ethanol-Fermentation durch *Saccharomyces cerevisiae* dar (Rose, 1961). Mit dem Aufkommen wirtschaftlicherer Erdöl-basierter Verfahren und der Tatsache, dass die bis dato verwendeten Substrate, wie Melassen,

Kartoffeln, Getreide oder Mais, Verwendung in der Futtermittelindustrie fanden, erfolgte nach dem Zweiten Weltkrieg eine Einstellung der biotechnologischen ABE-Produktion (Hastings, 1971). Die Ölkrise im Jahre 1973 ging nicht nur mit einem Anstieg der Rohölpreise einher sondern verdeutlichte zudem die Limitierung der weltlichen Erdölvorräte. Diese Tatsache führte zu einem erneuten wirtschaftlichen Interesse an solventogenen Clostridien und ließen somit auch *C. acetobutylicum* zum Gegenstand intensiver Forschung werden (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Um die mikrobielle Synthese von Aceton und Butanol gegenüber den petrochemischen Verfahren konkurrenzfähig zu machen, galt es schwerpunktmäßig sich der Unrentabilität der ABE-Fermentation, die vor allem in hohen Substratkosten, einer geringen Butanol-Toleranz (2 % [v/v]) und unerwünschten Nebenprodukten seine Begründung findet, zu widmen (Bahl & Gottschalk, 1988; Dürre, 1998). Der Fokus lag dabei insbesondere auf der Identifizierung der an der Solventogenese beteiligten Gene, Operone und Regulationsmechanismen sowie der biochemische Charakterisierung der verantwortlichen Enzyme (Bennett & Rudolph, 1995; Dürre *et al.*, 1995).

Zur Aufklärung der Funktion eines Gens, ist es naheliegend dieses durch eine gezielte Inaktivierung auszuschalten und den veränderten Phänotyp zu untersuchen. Der Mangel an entsprechenden molekularbiologischen Methoden für Clostridien machte dies jedoch zunächst unmöglich. Lange Zeit beschränkten sich die Techniken zur Mutationsgenerierung auf chemische Verfahren (Murray *et al.*, 1983) oder auf konjugative Transposons wie Tn4451 und Tn4452 von *C. perfringens* (Abraham & Rood, 1987) oder Tn916 aus *Streptococcus faecalis* (Franke & Clewell, 1981). Die Transposon-Mutagenese konnte erfolgreich in verschiedenen Clostridien eingesetzt werden (Babb *et al.*, 1993; Bertram & Dürre, 1989; Bertram *et al.*, 1990; Lin & Johnson, 1991; Mattsson & Rogers, 1994; Volk *et al.*, 1988; Woolley *et al.*, 1989). Der Nachteil dieser Methode bestand jedoch darin, dass die Transposons unspezifisch und mehrfach in das Genom inserieren. So konzentrierte sich die Forschung für eine Optimierung der Lösungsmittelproduktion anfangs auf die Überexpression homologer Gene (Boynton *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1992; Nair & Papoutsakis, 1994). Obgleich die Reduzierung der Enzym-Produktion auf genetischer Ebene zunächst in den Hintergrund rückte, entwickelten sich in den 90er Jahren auch Technologien zur Geninaktivierung, wie z.B. die „Campbell-like“ Integration durch homologe Rekombination von nicht-replikativen Plasmiden (Green *et al.*, 1996; Green & Bennett, 1998; Nair *et al.*, 1999; Wilkinson & Young, 1994). Dieses Verfahren konnte sich jedoch aufgrund mehrerer Faktoren nicht etablieren. Dazu gehören u. a. der Verbleib eines Selektionsmarkers im Genom und die daraus resultierende Interferenz des Antibiotikums mit nachfolgenden Analysen auf

genetischer Ebene, die relativ geringe Integrationseffizienz sowie die Tatsache, dass die Mutanten nur über 25 bis 30 Generation stabil waren (Heap, 2009; Jia *et al.*, 2011). Eine andere Methode, *Clostridium* genetisch zugänglich zu machen, stellte die Antisense-RNA Technologie dar. Bei diesem Verfahren wird die Proteinmenge auf Translationsebene entscheidend reduziert und folglich die Enzymaktivität beeinflusst, ohne dabei starke polare Effekte auf anderer benachbarte Gene auszulösen (Janssen *et al.*, 1990; Perret *et al.*, 2004; Thomason & Storz, 2010; Wagner & Simons, 1994). Im Jahre 1999 berichteten Desai *et al.* erstmals von einer erfolgreichen Anwendung in *C. acetobutylicum* zur „Herab“-Regulierung der Phosphotransbutyrylase (Ptb) und Butyrat-Kinase (Buk) (Desai & Papoutsakis, 1999). Mit dieser Technik konnten weitere Erkenntnisse über den solventogenen Stoffwechsel gewonnen und bekannte untermauert werden (Tummala *et al.*, 2003a; Tummala *et al.*, 2003b). Einen Meilenstein in der 100-jährigen Forschung von *C. acetobutylicum* symbolisiert die vollständige Sequenzierung des Genoms im Jahre 2001 (Nölling *et al.*, 2001).

Sie ermöglichte die Anwendung von Proteomuntersuchungen und Transkriptionsanalysen mittels DNA-Microarray Chips, Technologien die entscheidend zu einem besseren Verständnis der Physiologie dieses Organismus beitrugen, aber auch zu neuen Fragen führten, die aufgrund einer fehlenden effektiven Methode zur zielgerichteten Geninaktivierung offen blieben. Auf Grundlage der Entdeckung mobiler Gruppe-II-Introns, die in spezifische Genregionen inserieren und diese damit inaktivieren können (Karberg *et al.*, 2001), und der vorliegenden Genominformation von *C. acetobutylicum* etablierte sich 2007 jedoch eine neue Technologie für die Gattung *Clostridium* (Heap *et al.*, 2007). Die Verwendung des sogenannten ClosTron-System ermöglicht es Clostridien Gene sowohl effizient und gezielt als auch dauerhaft auszuschalten, wodurch sich neue Möglichkeiten für eine genetische Stammoptimierung ergaben.

Ein stark gestiegenes Interesse an der clostridiellen ABE-Fermentation nach der Ölkrise in den 70er Jahren und das aktuell wiederentdeckte Potential von *n*-Butanol als Biokraftstoff führte dazu, dass sich *C. acetobutylicum* einerseits zu einem Modellorganismus für apathogene Clostridien entwickelte (Lee *et al.*, 2008b; Ni & Sun, 2009; Papoutsakis, 2008) und zum anderen gerade aus den letzten zwei Jahrzehnten zahlreiche Methoden zur Überwindung der genetischen Unzugänglichkeit des Organismus hervorgingen (Lütke-Eversloh, 2014). Die Entwicklung molekularbiologischer Strategien zur biotechnologischen Stammoptimierung durch gezielte Manipulation enzymatischer oder regulatorischer Funktionen ging mit der Prägung einer Vielzahl von Begriffen einher. Die 1991 von James E.

Bailey verwendete Bezeichnung „Metabolic Engineering“ (Bailey, 1991; Stephanopoulos & Vallino, 1991) hat sich als Standardbegriff in der Mikrobiologie durchgesetzt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit war eingebettet in das vom BMBF geförderte europäische SysMO („systems biology of microorganisms“)-Teilprojekt COSMIC2 (*Clostridium acetobutylicum* systems microbiology) dessen Hauptziel darin bestand, ein *in silico* Modell des Metabolismus von *C. acetobutylicum* ATCC 824 zu entwickeln. Dabei galt es, mit Hilfe des ClosTron-Systems Mutanten des Zentralstoffwechsels sowie potentieller Regulatoren zu erzeugen. Um der grundlegenden Voraussetzung für die Erstellung rechenbasierter *in silico* Modelle gerecht zu werden, sollten die entsprechenden Insertionsmutanten anschließend in kontinuierlichen, Phosphat-limitierten Kulturen und somit unter dem Einfluss definierter Umweltfaktoren analysiert werden. Im Chemostaten werden standardisierte Bedingungen mit einem maximalen Grad an Reproduzierbarkeit gewährleistet. Die Stabilität des Systems beruht auf der Begrenzung der Wachstumsrate durch die Limitierung eines für das Wachstum notwendigen Substrates (z.B. P-Quelle). Somit entspricht die Wachstumsrate der Bakterienpopulation der Durchflussrate, also der Geschwindigkeit, mit der frisches Nährmedium zu- und Bakteriensuspension ab-geführt wird. Es entsteht ein Fließgleichgewicht („steady-state“), ein Zustand der sich durch eine annähernd gleichbleibende Zelldichte, exponentiell wachsende Zellen sowie konstante endogene und exogene Parameter (z.B. pH-Wert, Substrat- und Produktkonzentration, Wachstumsrate) auszeichnet. Im Gegensatz zu statischen Kulturen ermöglicht es diese Form der Kultivierung, beide Gärungsstoffwechselphasen in Abhängig vom pH-Wert stabil über einen langen Zeitraum aufrecht zu erhalten und Prozesse wie Sporulation und Lösungsmittelbildung strikt voneinander zu trennen (Grimmler *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2010). Auf Basis der kontinuierlichen Kulturen galt es eine globale Analyse der Genexpression (Transkriptom) unter Verwendung der DNA-Microarray-Technologie durchzuführen. Die um die Arbeitsgruppe von Patrick O. Brown (Lander, 1999; Schena *et al.*, 1995) entwickelte Methode ermöglicht eine globale, simultan vergleichende Analyse über die Transkriptionsmuster der Zellen eines Organismus unter ihren Kultivierungs- oder Prozessbedingungen (Duggan *et al.*, 1999; Ehrenreich, 2006).

Obleich die kontinuierliche Kulturführung bezüglich der industriell relevanten Butanolproduktion gegenüber der Batch- oder Fed-Batch-Kultur als nicht wettbewerbsfähig angesehen wird (Jones & Woods, 1986), stellt der Chemostat ein effektives Tool zur

Grundlagenforschung (Bahl *et al.*, 1982a). Die Charakterisierung der auf dem Clostron-System basierenden Insertionsmutanten sollte neue Einblicke in den komplexen Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* gewähren und somit neue Erkenntnisse im Blick auf die Butanolsteigerung und Nebenproduktreduktion liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Enzyme, Chemikalien und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Gase für anaerobes Arbeiten und Analysen durch Gaschromatographie wurden von der Firma AirLiquide AG (Düsseldorf) und Linde AG (München) geliefert. Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck GmbH (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Carl Roth & Co. (Karlsruhe) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad „pro Analysis“ oder „reinst“. Enzyme wurden bis auf die unten genannten Ausnahmen von der Fermentas GmbH (St.Leon-Rot) bezogen.

Spezielle Chemikalien, Enzyme oder sonstige Produkte aus anderen Bezugsquellen sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 2.1: Bezugsquellen

Chemikalien	
Reinforced Clostridial Agar (RCA)	Oxoid, Hampshire, UK
50 x Denhart`s solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Biotinylated 2-Log DNA Ladder (0.1-10 kb)	NEB, Frankfurt am Main
random hexamers p(dN ₆)	Roche, Mannheim
dNTP-Nukleotid-Mix	Roche, Mannheim
Oligonukleotide	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Cy TM 3-dCTP bzw. Cy TM 5-dCTP	GE Healthcare Europe GmbH, München
Enzyme	
<i>Bsr</i> GI	NEB, Frankfurt am Main
<i>Hind</i> III	NEB, Frankfurt am Main
Turbo DNase	Ambion, Huntington/Austin, TX, USA
DNase (10U/μl)	Roche, Mannheim
Phire Hot-Start II DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kits	
QIAquick PCR Purification	Qiagen, Hilden
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Biotin DecaLabi DNA Labeling Kits	Thermo Scientific, Waltham, USA
AxyPrep TM Plasmid Miniprep Kit	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Mannheim

Master Pure DNA Purification Kit	Epicentre, Madison, USA
L-Lactic Acid (L-Lactat) Kit	Megazyme International Ltd., Wicklow, Irland
D-Glucose Assay Kit (GOPOD Format)	Megazyme International Ltd., Wicklow, Irland

Geräte & Materialien

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Magnet-Heizrührer	JAK Werk, Staufen
Hybridisierungsröhrchen, Hungates	OCHS Laborfachhandel e. K., Bovenden
Anaerobenfläschen	OCHS Laborfachhandel e. K., Bovenden
Vakuumblotter	Bio-Rad Laboratories, California USA
Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories, California USA
Tischzentrifuge	Haereus Holding GmbH, Hanau
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
UV/VIS-Spektrometer Ultrospec®3300pro	Amersham Pharmacia Biotech
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach
Scanner GenePix 4000B	Axon Instruments, Union City, USA
Tecan Hybridization Station HS400Pro	Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Österreich
Automated Slide Processor	ASP Lucidea, Amersham Pharmacia Biotech
iCycler iQ Real-timePCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, California USA
Alpha Imager Mini	Biozym, Hess. Oldendorf
Anaerobenkammer	Töpffer lab systems, Göppingen
FlexCycler	Jena Analytik, Jena

2.2 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der Tabelle 2.2, die Vektoren in der Tabelle 2.3 und die rekombinanten Plasmide in der Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Organismen

Stamm	Geno-/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Wildtyp	American Type Culture Collection
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>adc::int(180)*</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 180 und 181 des <i>adc</i> -Gens (CAP0165), Erm ^R	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a

<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>pta::int(80)*</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 80 und 81 des <i>pta</i> -Gens (CAC1742), Erm ^R	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>adc::int(180)-pta::int(80)ΔRAM*</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 180 und 181 des <i>adc</i> -Gens (CAP0165), Erm ^R , Insertion eines Gruppe II-Introns ohne RAM zwischen bp 80 und 81 des <i>pta</i> -Gens (CAC1742)	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>ptb::int(87)*</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 87 und 88 des <i>ptb</i> -Gens (CAC3076), Erm ^R	Lehmann <i>et al.</i> , 2012b
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>hbd::int(69)*</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 69 und 70 des <i>hbd</i> -Gens (CAC2708), Erm ^R	Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>adhE2::int(696)**</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 696 und 697 des <i>adhE2</i> -Gens (CAP0035), Erm ^R	Cooksley <i>et al.</i> , 2012
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>pdC::int(843)</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 843 und 844 des <i>pdC</i> -Gens (CAP0025), Erm ^R	Diese Arbeit
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>pflA::int(60)</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 60 und 61 des <i>pflA</i> -Gens (CAC981), Erm ^R	Diese Arbeit
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>pflB::int(1335)</i>	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen bp 1335 und 1336 des <i>pflA</i> -Gens (CAC980), Erm ^R	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> ER2275	<i>trp-31</i> , <i>his-1</i> , <i>tonA2</i> , <i>rpsL104</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>metB1</i> , <i>el4-</i> , Δ(<i>lac</i>)U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , R(<i>zbgZ10::Tn10</i>) Tcs, Δ(<i>mcr-hsdmrr</i>) 114::1510, [F ['] , <i>proAB</i> , <i>laqlqZ</i> ΔM15 <i>zzf::mini-Tn10</i> (Kmr)]	Prof. E.T. Papoutsakis, Northwestern University, Evanston, USA

* zur Verfügung gestellt durch: Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie, Dr. T. Lütke-Eversloh

** zur Verfügung gestellt durch: University of Nottingham, Centre of Biomolecular Sciences, Clostridia Research Group, Prof. N. Minton

Tabelle 2.3: Vektoren

Plasmid	Größe (bp)	Geno-/Phänotyp	Referenz/Herkunft
pMTL007C-E2	8926	Cm ^R ; oripMB1/ColE1, oripCB102, oriT, ltrAB	Heap <i>et al.</i> , 2010

Tabelle 2.4: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Insertgröße (bp)	Geno-/Phänotyp	Referenz/Herkunft
pMTL007C:: <i>cac0981</i> _Intron	350	pMTL007C-E2, <i>cac0981</i> _Intron, <i>HindIII</i> , <i>BsrGI</i>	Diese Arbeit
pMTL007C:: <i>cac0980</i> _Intron	350	pMTL007C-E2, <i>cac0980</i> _Intron, <i>HindIII</i> , <i>BsrGI</i>	Diese Arbeit
pMTL007C:: <i>cap0025</i> _Intron	350	pMTL007C-E2, <i>cap0025</i> _Intron, <i>HindIII</i> , <i>BsrGI</i>	Diese Arbeit

2.3 Nährmedien

Sofern nicht anders dokumentiert, wurden alle Nährmedien mit deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 1,2 bar sterilisiert. Für die Herstellung von Plattenmedien erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar-Agar. Thermolabile Substanzen sowie die C-Quelle wurden gelöst, sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm, Sartorius, Göttingen) und dem Flüssig- oder Festmedium nach Abkühlen auf ca. 55 °C zugegeben.

2.3.1 Medium für *E. coli*

Lurani-Bertani-Medium (LB) (Sambrook & Russel, 2001)

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

Der pH -Wert des Mediums lag ohne Einstellung zwischen 7 und 7,5.

2.3.2 Medien für *C. acetobutylicum*

Nach der Einstellung des pH-Wertes erfolgte das Autoklavieren der in den Kulturflaschen (Brennstein Laborbedarf, Markt Schwaben, Deutschland) luftdicht verschlossenen Nährmedien. Im Anschluss an die Zugabe der thermolabile Substanzen und der C-Quelle wurde das warme Medium ca. 20 min über einen Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm, Sartorius, Göttingen) mit N₂ begast, um noch gelösten Sauerstoff zu entfernen. Wenn keine Entfärbung des Redoxindikators Resazurin (Endkonzentration im Medium: 0,0001 % [w/v]) erfolgte, wurde vor Verwendung der Nährmedien noch vorhandener Restsauerstoff durch das Zutropfen von Titanitrilotriessigsäure (Titan-III-NTA) (2.3.3) reduziert.

CG-Medium (clostridial growth medium) (Wiesenborn *et al.*, 1988; mod.)

Glukose	50	g
Hefeextrakt	5	g
Asparagin	2	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
NaCl	1	g
KH ₂ PO ₄	0,75	g
K ₂ HPO ₄	0,75	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,71	g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,010	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,010	g
Resazurin (0,1 % [w/v])	1	ml
H ₂ O	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde mit 6 M NaOH auf 6,9 eingestellt. Die Zugabe der sterilfiltrierten Lösungen von Glukose, Asparagin und FeSO₄ x 7 H₂O erfolgte nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ca. 55 °C.

MS-MES Medium (medium synthétique) (Monot *et al.*, 1982; mod.)

Glukose	60	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22	g
KH ₂ PO ₄	0,55	g
K ₂ HPO ₄	0,55	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,011	g
Eisessig	2,3	ml
PABA (8 mg/l) (200x)*	5	ml
Biotin (0,08 mg/l) (500x)*	2	ml
MES	21,3	g
Resazurin (0,1 % [w/v])	1	ml

H₂O ad 1000 ml

Vor der Zugabe von MS-MES wurde der pH-Wert mit 6 M NaOH auf 7,3 eingestellt.

* Diese Komponenten wurden aus Stammlösungen nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ca. 55 °C zugegeben.

RCA (reinforced clostridial agar)*

Glukose	5	g
Hefeextrakt	3	g
Trypton	10	g
NaCl	5	g
Fleischextrakt	10	g
Na-Acetat	3	g
Cystein-HCl	0,5	g
Stärke	1	g
Agar-Agar	15	g
H ₂ O	ad 1000	ml

* RCA wurde als fertiges Gemisch kommerziell bei der Firma Oxoid (Wesel) erworben.

MMVK-Medium (Minimalmedium für Vorkulturen) (Bahl *et al.*, 1982)

Glukose	20	g
CaCO ₃	1	g
KH ₂ PO ₄	1	g
K ₂ HPO ₄	1	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
Salzlösung*	10	ml
Vitaminlösung*	10	ml
Resazurin (0,1 % [w/v])	1	ml
FeSO ₄ x 7 H ₂ O		
Na ₂ S ₂ O ₄		
H ₂ O	ad 1000	ml

* Die Zugabe der Salzlösung erfolgte vor dem Autoklavieren. Danach bzw. kurz vor dem Beimpfen wurden Na₂S₂O₄, FeSO₄ x 7 H₂O, Glukose sowie die Vitaminlösung zugesetzt (siehe 2.2.3)

Phosphat-limitiertes Minimalmedium für kontinuierliche Kulturen

(Bahl *et al.*, 1982; Fischer *et al.*, 2006, mod.)

Glukose	600	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	g
KH ₂ PO ₄	1,05	g

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,5	g
NaCl	0,15	g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,15	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,15	g
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,225	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,225	g
Vitaminlösung*	150	ml
H ₂ O	ad 15000	ml

Einstellen des pH-Wertes mit H₂SO₄ auf 2,2. Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe der sterilfiltrierten thermolabilen Substanzen.

2.3.3 Medienzusätze

Medienzusätze wurden als Stammlösungen angesetzt und im Bedarfsfall den unter 2.3.1 sowie 2.3.2 aufgeführten Kulturmedien nach Abkühlung auf ca. 55 °C (Festmedien) oder direkt vor Gebrauch (Flüssigmedien) in entsprechenden Endkonzentrationen zugefügt (Tabelle 2.5). Alle Lösungen wurden in Aliquots bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Salzlösung für Minimalmedium (100-fach konzentriert)

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1	g
NaCl	0,1	g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,1	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1	g
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,15	g
H ₂ O	ad 100	ml

Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Vitaminlösung für Minimalmedium (100-fach konzentriert)

Biotin	10	mg
Thiamin-HCl	200	mg
p-Aminobenzoessäure	200	mg
H ₂ O	ad 1000	ml

Lösung wurde sterilfiltriert und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Titan-(III)-NTA-Lösung

Nitrilotriessigsäure (NTA)	5,73	g
NaOH (5 M)*	20	ml
TiCl ₃ -Lsg. (15 % [w/v])	6,4	ml

Na ₂ CO ₃ (2 M)*	10	ml
H ₂ O*	ad 75	ml

* anaerob

Zur Herstellung von 75 ml einer 100 mM Titan-(III)-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Lösung wurden 5,73 g NTA (400 mM) in 30 ml H₂O sowie 20 ml 5 M NaOH gelöst und mit N₂ begast. Anschließend erfolgte im Anaerobenzelt unter ständigem Rühren die gleichzeitige Zugabe der TiCl₃- und der 2 M Na₂CO₃-Lösung, bevor mit anaerobem H₂O auf 75 ml aufgefüllt und die fertige Titan-(III) NTA-Lösung steril filtriert werden konnte.

Tabelle 2.5: Medienzusätze

Mediumzusatz	Stammlösung	Arbeitslösung
Ampicillin	50 mg/ml in <i>A. dest</i> (sterilfiltriert)*	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in EtOH (96 % (v/v))**	25 µg/ml
Erythromycin	50 mg/ml in EtOH (96 % (v/v))**	20 µg/ml
Thiamphenicol	50 mg/ml in EtOH (96 % (v/v))**	15 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in EtOH (50 % (v/v))**	10 µg/ml
Formiat	100 mM in H ₂ O	1 - 5 mM/ml
Adenosin	100 mM in H ₂ O	1 mM/ml
Guanosin	100 mM in H ₂ O	1 mM/ml
Cytidin	100 mM in H ₂ O	1 mM/ml
Thymidin	100 mM in H ₂ O	1 mM/ml
Uracil	100 mM in H ₂ O	1 mM/ml
FMN	1 mM in H ₂ O	10 - 50 µM/ml

* Porengröße 0,2 µm (Sterilfilter, Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen, Deutschland)

** in Ethanol gelösten Substanzen brauchen nicht sterilfiltriert werden

2.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Für eine Lagerung bis zu 4 Wochen wurden häufig benötigte Stämme von *E. coli* auf LB-Agarplatten (2.3.1) ausgestrichen, bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Zum Schutz vor Austrocknung und Kontamination wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen. Für die Langzeitkonservierung wurde 1 ml einer exponentiell gewachsenen Kultur mit 0,5 ml LB-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) versetzt, anschließend gründlich durchmischt und bei -70 °C gelagert.

Eine langfristige Konservierung der *C. acetobutylicum*-Stämme konnte durch die Erzeugung von Sporensuspensionen erreicht werden. Zu diesem Zweck wurden 150 µl einer

logarithmisch wachsenden Kultur auf einer, gegebenenfalls mit Antibiotika versetzten, CGM-Agarplatte (2.3.2) ausplattiert und im Anaeroben-Topf bei 37 °C für ca. 7 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter anaeroben Bedingungen mit Hilfe eines Drigalski-Spatels und 5 ml CG-Medium abgeschwemmt, in 2 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und bei -70 °C gelagert. Alternativ konnten auch Glycerinkulturen angelegt werden. Dafür wurden 850 µl einer Übernachtskultur mit 350 µl 87 %igem Glycerin versetzt und ebenfalls bei -70 °C gelagert.

Die Reinheit und Vitalität der Stammkulturen wurde durch die mikroskopische Überprüfung auf eine einheitliche Zellmorphologie, als auch durch regelmäßige Reinheitsausstriche gewährleistet.

2.5 Zellanzucht

2.5.1 Zellanzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob in LB-Flüssigmedium (2.3.1) bei 37 °C und unter Schütteln (150 - 180 U/min) in Reagenzgläsern, wobei bis zu 0,1 Vol. einer Stammkultur (2.4) bzw. einer Vorkultur oder Zellmaterial eines auf Festmedien kultivierten Stamms als Inokulum genutzt wurden. Im Bedarfsfall wurden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Antibiotika hinzugefügt. Die Zellanzucht von *E. coli* auf LB-Agarplatten erfolgte bei 37 °C im Brutraum.

2.5.2 Zellanzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Agarplatten (2.3.2) erfolgte bei 37 °C in einem Anaeroben-Top unter Stickstoffatmosphäre. Medienplatten wurden aerob gegossen und drei Tage vor Gebrauch in das Anaerobenzelt (Töpffer lab Systems, Göppingen, Deutschland) eingeschleust.

2.5.3 Zellanzucht von *C. acetobutylicum* in Batch-Kultur

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* in Flüssigmedium erfolgte anaerob bei 37 °C unter abgeschlossener N₂-Atmosphäre. Als Inokulum wurden 0,1 Vol. einer Stammkultur (2.4) oder Zellmaterial eines auf Festmedien (2.5.2) kultivierten Stamms genutzt. Die Inokulation mit Sporensuspensionen erforderte das Pasteurisieren (80 °C, 10 min) der Kultur vor der Inkubation, um eine Inaktivierung vegetativer Zellen zu gewährleisten. Im Falle eines notwendigen Medienwechsels ließen sich die Komponenten des Komplexmediums CGM

(2.3.2) durch zwei Passagen in dem jeweils neuen Nährmedium ausdünnen. Bis zu einem Volumen von 10 ml wurden Hungate-Röhrchen (Ochs GmbH, Bovenden, Deutschland) mit Butyl-Septen und Schraubdeckeln verwendet. Bei Kulturvolumina von 10 ml bis 50 ml wurden Anaerobenflaschen (Brennstein Laborbedarf, Markt Schwaben, Deutschland) mit Butylstopfen und Alu-Bördelkappen eingesetzt. Bei einem Volumen von mehr als 50 ml erfolgte eine Anzucht in Kulturflaschen mit Naturgummistopfen und Edelstahldeckeln (Brennstein Laborbedarf, Markt Schwaben, Deutschland). Um eine Zerstörung der Kulturgefäße durch produzierte Gase wie Kohlendioxid und Wasserstoff zu vermeiden, wurden diese nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens mit Medium befüllt.

2.5.4 Zellanzucht von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur

2.5.4.1 Vorkultur

Die Vorkulturen wurden wie unter 2.5.3 beschrieben vorbereitet. Eine 10 ml CGM-Vorkultur diente zur Inokulation einer 100 ml MMVK-Vorkultur. Nach einer 8 - 16 stündigen Inkubation bei 37 °C wurden ausschließlich gut gasende Kulturen zum Beimpfen des Kulturgefäßes genutzt.

2.5.4.2 Kontinuierliche Kulturführung

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Kultur erfolgte in einem Kulturgefäß mit einem Kesselvolumen von 1,0 Liter (Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen, Deutschland). Der schematische Aufbau ist in der Abbildung 2.3 dargestellt.

Eine Steuereinheit vom Typ BIOSTAT® Bplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen, Deutschland) mit integrierten Peristaltikpumpen gewährleistete den geregelten Fermentationsprozess. Die Kulturführung verlief in anaerober Atmosphäre bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, der pH-Wert wurde automatisch durch die Zugabe von 2 M KOH reguliert. Die Zufuhr des Phosphat-limitierten Minimalmediums (2.3.2) erfolgte mit einer Durchflussrate von $0,075 \text{ h}^{-1}$, was einem kompletten Wechsel des Mediums in 13,33 h entsprach. Um die gewünschte Verdünnungsrate über eine konstante Zuflussrate des Mediums einzustellen wurde das gepumpte Volumen pro Minute in Abhängigkeit der prozentualen Pumpleistung ermittelt. Vor dem Animpfen wurde das mit 615 ml MMVK-Medium (2.3.2) gefüllte Kulturgefäß für 30 min bei 121 °C und 1,2 bar Überdruck autoklaviert und anschließend während des Abkühlens mit molekularem Stickstoff durchgast. Vor dem Beimpfen des Kulturgefäßes mit 100 ml einer 8 - 16 h alten, logarithmisch wachsenden

MMVK-Vorkultur (2.5.4.1) erfolgte die Zugabe der über einen Bottle-Top-Filter (500 ml, 0,22 μm , GL45; Zefa-Laborservice GmbH, Grasbrunn, Deutschland) sterilfiltrierten thermolabilen Substanzen. Anschließend wurde das Medium mit maximal 1 ml einer Titan-(III)-NTA-Lösung (2.3.3) bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin reduziert, die Rührung auf 50 U/min und die pH-Regulation auf 5,7 eingestellt. Nachdem die Kultur angewachsen war (OD_{600} ca. 2-3 [2.6.1]) wurde die Rührung auf 200 U/min erhöht und die Substratpumpe für die Zufuhr des Vorratsmediums zugeschaltet, was einhergeht mit dem Beginn der kontinuierlichen Kulturführung.

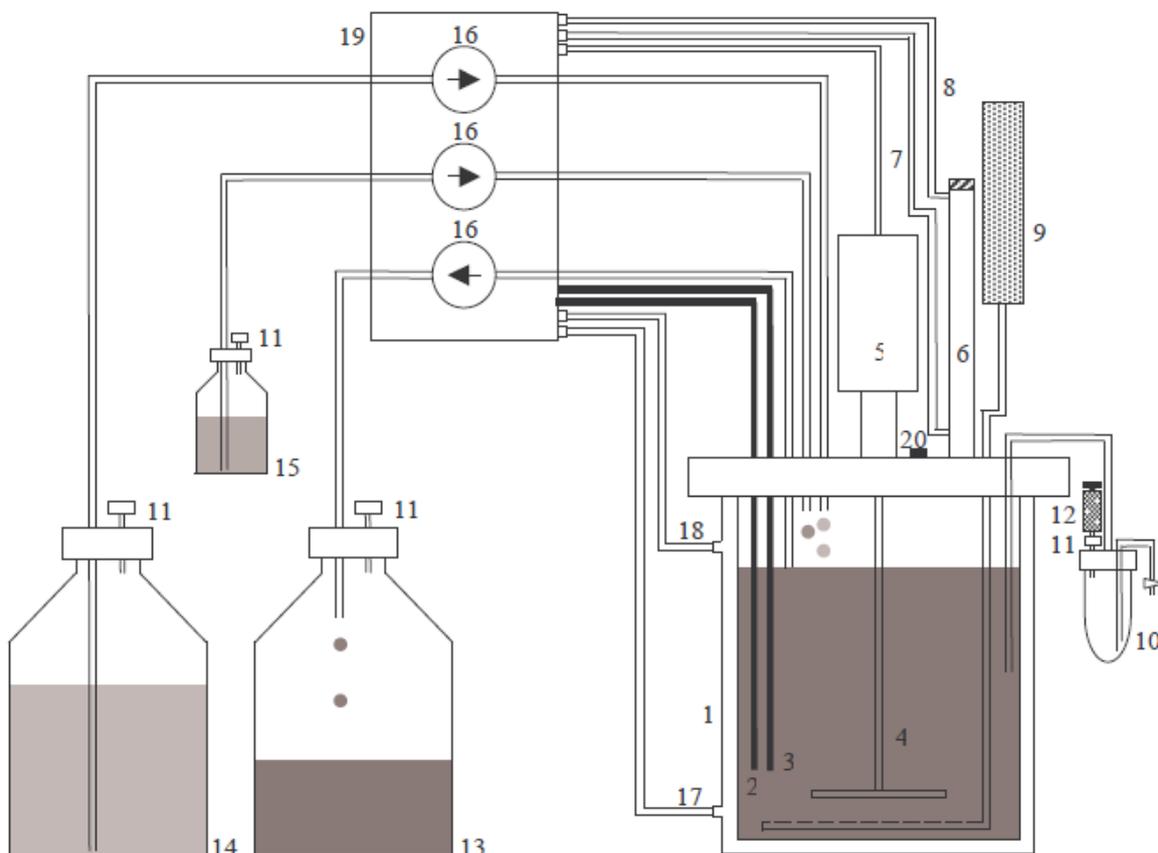


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Fermenters für die Phosphat-limitierte kontinuierliche Kultur von *C. acetobutylicum* (Schwarz, 2007). (1) 1-l-Kulturgefäß mit doppeltem Glasmantel zur Temperaturregulation, (2) Temperatursfühler, (3) pH-Sonde, (4) Rührer, (5) Rührermotor, (6) Abluftkühler, (7) Kühlwasserzulauf, (8) Kühlwasserablauf, (9) N_2 -Begasungsanlage mit Kupferkatalysator-Reduziersäule (Ochs GmbH, Bovenden, Deutschland), (10) Handprobennehmer, (11) Sterilfilter (0,22 μm , Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen, Deutschland), (12) 10-ml-Einwegspritze, (13) 20-l-Duran®-Weithals-Standardflasche (Duran, Mainz) zum Auffangen des Kulturüberstandes, (14) 20-l-Duran®-Weithals-Standardflasche (Duran, Mainz) als Medium-Vorratsflasche, (15) Vorratsgefäß mit 2 M KOH, (16) Schlauchpumpen (in Steuereinheit integriert, Pfeile geben die Pumprichtung an), (17) Wasserzulauf für den Glasmantel, (18) Wasserablauf für den Glasmantel, (19) BiostatBplus-Fermentations-Steuereinheit, (20) Silikon-Membran für Direkteinspritzung.

2.6 Bestimmung der physiologischen Parameter

2.6.1 Optische Dichte

Zur Verfolgung des Zellwachstums von Flüssigkulturen wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe eines UV/VIS-Spectrometers (Ultrospec® 3300 pro, Amersham Pharmacia Biotech) gegen den entsprechenden Medienleerwert in einer Halb-Mikro-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Bei Extinktionen über 0,3 erfolgte eine entsprechende Verdünnung der Proben, um im linearen Messbereich des Gerätes zu bleiben und somit Messungenauigkeiten zu vermeiden.

2.6.2 Berechnung des Wachstums

Zur Bestimmung des Wachstums einer Bakterienkultur wird die Wachstumsrate (μ) ermittelt, die die massenabhängige Verdopplung pro Stunde anzeigt:

$$\mu = \frac{\log x_2 - \log x_1}{\log e \cdot (t_2 - t_1)}$$

Formel 1: Wachstumsbestimmung. $x_{1/2}$: Messwert zu den Zeitpunkten 1 und 2; $t_{1/2}$: Messwert zu den Zeitpunkten 1 und 2

2.6.3 Gaschromatische Bestimmung des Produktspektrums

Die Analyse und Quantifizierung flüssiger Gärungsprodukte erfolgte mit Hilfe des Gaschromatographen GC-2010 der Firma Shimadzu. Zur Detektion wurde eine Stabilwax-DA-Säule verwendet. Als Trägergas diente Stickstoff, welches über einen Feuchtigkeits- und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde. Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden in 2-ml Reaktionsgefäßen für 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, um einen zellfreien Kulturüberstand zu erhalten. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Um eine Quantifizierung der Proben zu ermöglichen, wurde vor den Messungen eine Kalibrierung der zu detektierenden Fermentationsprodukte mit verschiedenen bekannten Konzentrationen (0,000001 – 0,1 g/l) durchgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen sollten für eine gute Quantifizierung innerhalb der Kalibriergrenzen liegen. Um die Möglichkeit von Messfehlern zu minimieren, wurden außerdem bei jedem Probenlauf 3 verschiedene Konzentrationen eines Standardgemisches der zu analysierenden Metabolite mitgeführt. Dieses Standardgemisch wurde mit angesäuertem Wasser (pH 2,5, eingestellt mit HCl)

verdünnt. Zur Quantifizierung wurde zu 9/10 Vol. Probe 1/10 Vol. interner Standard zugesetzt. Als interner Standard diente 1-Propanol in einer finalen Konzentration von 0,005 g/l. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GC solution von Shimadzu.

2.6.4 Bestimmung der Glukosekonzentration

Um den Glukoseverbrauch der verschiedenen *C. acetobutylicum*-Stämme (siehe Tabelle 2.2) zu detektieren, wurde das „D-Glucose (GOPOD) Kit“ der Firma Megazyme (Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Irland) verwendet. Die hier angewandte Methode basiert auf der Wasserstoffperoxid-Indikatorreaktion, die 4-Aminoantipyrin mit einer Phenolkomponente verbindet. Die im Kulturüberstand enthaltene Glukose wird durch die Glukose-Oxidase zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert. In einem weiteren Reaktionsschritt reagiert das entstandene Wasserstoffperoxid im Beisein von Peroxidase mit 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Aminoantipyrin, wobei ein roter Chinonimin-Farbstoff entsteht. Die Farbintensität ist zur Glukosekonzentration proportional und kann photometrisch bei 510 nm gemessen werden. Auf Grundlage der ermittelten Absorptionswerte ließ sich die Glukosekonzentration berechnen. Um photometrische Ungenauigkeiten und Pipettierfehler ausschließen zu können, wurde von allen Proben eine zweifach-Bestimmung vorgenommen. Für die enzymatische Bestimmung wurden die Proben 1:20 oder 1:50 mit H₂O_{dest} verdünnt und mit den in Tabelle 2.6 aufgeführten Komponenten in eine Halb-Mikro-Küvette (d = 1 cm) überführt. Die Reaktionsansätze wurden lichtgeschützt bei 45 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 510 nm gegen die Leerprobe gemessen, um $\Delta A_{\text{Kulturüberstand}}$ und $\Delta A_{\text{D-Glukose Standard}}$ zu erhalten. Für die Berechnung der D-Glukosekonzentration wurde, unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe, folgende Formel verwendet:

$$\text{D-Glukose (g/l)} = \frac{\Delta A_{\text{Kulturüberstand}}}{\Delta A_{\text{D-Glukose Standard}} (100 \mu\text{g})} \cdot \text{Verdünnungsstufe}$$

Formel 2: Bestimmung der Glukosekonzentration.

Tabelle 2.6: Reaktionsansatz D-Glukosebestimmung

Komponente	Blank	Probe	D-Glukose Standard
GOPOD - Lösung	1,50 ml	1,50 ml	1,50 ml
D-Glukose Standard	-	-	0,05 ml
Probe (zellfreier Überstand)	-	0,05 ml	-
H ₂ O _{dest}	0,05 ml	-	-

2.6.5 Bestimmung der Laktatkonzentration

Das während des Wachstums gebildete Laktat wurde unter Verwendung des Kits „L-Lactic Acid (L-Lactate)“ der Firma Megazyme (Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Irland) erfasst. Dabei wird das im Kulturüberstand vorhandene L-Laktat in einer ersten Reaktion durch eine L-Laktatdehydrogenase [EC 1.1.1.27] in Anwesenheit von NAD^+ zu Pyruvat oxidiert. In der zweiten Reaktion wird das entstandene Pyruvat durch das Enzym D-Glutamat-Pyruvat-Transaminase [EC 2.6.1.2] zu D-Alanin und 2-Oxoglutarat umgewandelt, womit einer Rückreaktion zum Laktat entgegen gewirkt wird. Die gebildete Menge an NADH ist direkt proportional zur Laktatmenge und kann photometrisch durch Bestimmung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm nachgewiesen werden. Von allen Proben wurde eine zweifach-Bestimmung vorgenommen, um photometrische Ungenauigkeiten und Pipettierfehler ausschließen zu können. Die Laktatkonzentration wurde nach folgendem Protokoll bestimmt:

1. Zentrifugation der Zellsuspension (13.000 U/min, 10 min, 4 °C)
2. Zugabe folgender Komponenten in eine Halb-Mikro-Küvette mit 1 cm Schichtdicke (für den Blank-Ansatz wurde H_2O anstelle der Probe eingesetzt):

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	750 μl
Probe (zellfreier Überstand - ggf. verdünnt)	50 μl
Glycylglycin Puffer	250 μl
NAD^+	50 μl
D-GTP	10 μl
3. Mischen der jeweiligen Reaktionsansätze und Inkubation für 3 min bei RT
4. Leerwertbestimmung bei 340 nm (A_1)
5. Zugabe von 10 μl L-Laktatdehydrogenase und Mischen des Ansatzes
6. Inkubation für 10 min bei RT und Bestimmung der der Extinktion bei 340 nm (A_2)

Folgende Formel wurde zur Laktatbestimmung verwendet:

$$\text{L-Laktat (g/l)} = \frac{V \cdot \text{MW}_{\text{Laktat}}}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{\text{L-Laktat}}$$

Formel 3: Bestimmung der Laktatkonzentration. V = Volumen der Probe (1,12 ml); $\text{MW}_{\text{Laktat}} = 90,1 \text{ g/l}$; $\epsilon = 0,63 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1} = 6,3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; d = Schichtdicke der Küvette (1 cm); v = Volumen der Probe (0,05 ml); $\Delta A_{\text{L-Laktat}}$ = Extinktionsdifferent ($A_2 - A_1$)

2.6.6 Bestimmung der Riboflavinkonzentration

Die Bestimmung der Riboflavinkonzentration in Flüssigmedien erfolgte durch eine mit Natriumdithionit hervorgerufene Redoxreaktion (Abbildung 2.4).

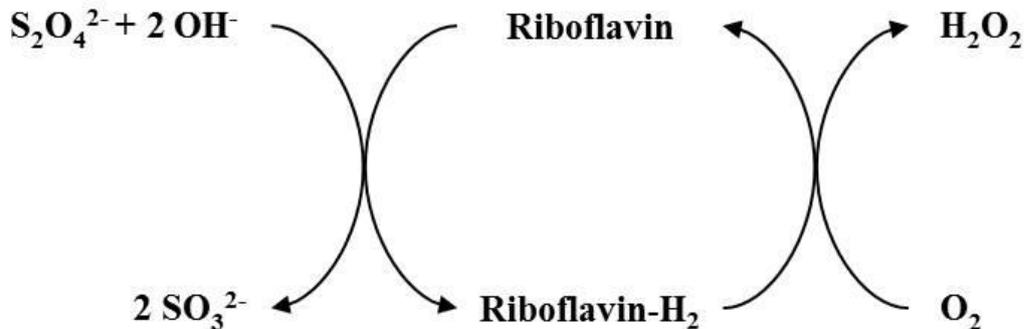


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung einer durch Dithionit hervorgerufenen Redoxreaktion von Riboflavin.

Bei Zugabe einer 1 %igen $Na_2S_2O_4$ -Lösung wird das im Kulturüberstand vorhandene Riboflavin unter Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen reduziert und geht dabei in die farblose Leukoform über (Riboflavin- H_2). Gleichzeitig werden die Schwefelatome im Dithionit unter Abgabe eines Elektrons zu Sulfit oxidiert. Durch den Luftsauerstoff wird das Dihydroflavin unter Abgabe von zwei Elektronen und zwei Protonen zum Riboflavin reoxidiert.

Tabelle 2.7: Reaktionsansatz zur Bestimmung der Riboflavinkonzentration in Flüssigkulturen

Komponente	Blank	Probe
H_2O_{dest} *	800 μ l	800 μ l
Probe (zellfreier Überstand)*	200 μ l	200 μ l
$Na_2S_2O_4$ (1 mg/ml)**	-	500 μ l
H_2O_{dest}	500 μ l	-

* die eingesetzten Volumina entsprachen der Verdünnungsstufe

** kurz vor dem Gebrauch frisch hergestellt

Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden in 2-ml Reaktionsgefäßen für 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, um einen zellfreien Kulturüberstand zu erhalten. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zum Gebrauch lichtgeschützt bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zur Quantifizierung wurden die in

Tabelle 2.7 aufgeführten Komponenten in eine Halb-Mikro-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt. Die $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung war stets frisch herzustellen und wurde erst unmittelbar vor der Messung dem Reaktionsansatz (Probe) zugesetzt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 455 nm gegen den zu gleichen Kulturüberstand ohne $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung (Blank) gemessen. Mit Hilfe einer mit Riboflavin erstellten Eichgerade im Bereich von 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ konnten die Riboflavinkonzentrationen, unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe, in den Proben errechnet werden. Die Bestimmungen erfolgten stets im Doppelansatz.

2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.7.1 Vorbehandlung von Lösungen und Geräten

Um eine Kontamination durch Nukleasen zu vermeiden, wurden alle thermostabilen Lösungen, Glaswaren und andere Materialien, die für das Arbeiten mit Nukleinsäuren notwendig waren, durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C und 1,2 bar) sterilisiert. Bei thermolabilen Lösungen erfolgte eine Sterilfiltration (Spritzenvorsatzfilter, 0,22 μm , Sartorius, Göttingen, Deutschland). Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 96 %igem [v/v] Ethanol behandelt oder abgeflammt. Die Desinfektion von Arbeitsflächen und hitzelabilen Gebrauchsgegenständen erfolgte kurz vor Gebrauch mit 70 %igem [v/v] Ethanol.

Alle für den Umgang mit RNA benötigten thermostabilen Lösungen und Materialien wurden zweimal bei 121 °C für 30 min autoklaviert. Die Geräte sowie der Arbeitsplatz wurden mit RNase-ExitusPlus™ (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gesäubert. Die Arbeiten wurden ausschließlich mit ebenso behandelten Einweghandschuhen durchgeführt, um mögliche Kontaminationen mit den sehr stabilen RNasen zu vermeiden.

2.7.2 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen wurde eine alkalische Lyse unter Verwendung des AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kits (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) gemäß der vom Hersteller mitgelieferten Anleitung durchgeführt. Die hier verwendeten Säulen verfügen über eine Silikat-Gel-Membran, an welche Plasmid-DNA während der Aufreinigung selektiv bindet. Proteine und andere zelluläre Verunreinigungen können nicht binden und werden somit abgetrennt. Die gewonnene

hochreine DNA ist darüber hinaus frei von RNA, da bereits während der Lyse eine RNase-Behandlung erfolgt.

Anschließend wurde die Qualität der isolierten Plasmid-DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel (2.7.5) überprüft.

2.7.2.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte auf Grundlage der von Bertram und Dürre (1989; mod.) entwickelten Methode. Hierfür wurden 2 ml Zellsuspension einer gut gewachsenen Kultur durch Zentrifugation (11.000 U/min, 5 min, 4 °C) sedimentiert, das Zellpellet mit 1 ml Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,5) gewaschen und anschließend in 1 ml STE-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 100 µl Lysozym (40 mg/ml) und einer Inkubation von 1 h bei 37 °C aufgeschlossen. Im Anschluss wurden 70 µl SDS (10 %), 65 µl EDTA (pH 8) sowie 5 µl Tris-HCl (pH 8) zugegeben und der Ansatz durch Schwenken gut vermischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation der RNase A (10 mg/ml) bei 100 °C wurden 15 µl der selbigen dem Ansatz zugefügt. Nach einer Inkubation auf für 10 min auf Eis folgte die Zugabe von 3 µl Proteinase K (50 mg/ml) und eine Proteolyse für 2 h bei 37 °C. Nach der Zugabe von 180 µl Na-Perchlorat-Lösung (5 M) und gutem Mischen wurde der Ansatz einer Phenol-Chloroform-Extraktion (2.7.4.1) unterzogen. Im Anschluss wurde die DNA-haltige Lösung mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt (2.7.4.3). Das DNA-Pellet wurde bei 37 °C im Thermoblock luftgetrocknet und anschließend in 100 µl sterilem H₂O bei 4 °C gelöst.

Alternativ wurde, für eine schnellere Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*, das „Master Pure DNA Purification Kit“ (Epicentre, Madison, USA) verwendet. Für die Lyse der Zellen wurde das Zellpellet in 150 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert, mit 30 µl Lysozym (20 mg/ml) versetzt und gut gemischt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 30 min erfolgte die Zugabe von 180 µl „2 x T & C Lysis Solution“ sowie 1 µl Proteinase K (50 mg/ml). Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 65°C. Nach einem Abkühlen auf Eis (10 min), erfolgte der Verdau enthaltener RNA durch Zugabe von 15 µl RNase A (10 mg/ml). Der Ansatz wurde durch Schwenken vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 210 µl „MPC Protein Precipitation Reagent“ und ein Vortexen für ca. 10 Sekunden. Der Ansatz wurde im weiteren Verlauf für 10 min bei 4 °C und 11.000 U/min zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und einer Isopropanol-Fällung (2.7.4.3) unterzogen werden. Danach wurde die

pelletierte DNA bei 37 °C im Thermoblock luftgetrocknet, bevor sie in 100 µl sterilen H₂O gelöst wurde.

Die Bestimmung der Konzentration von DNA (2.7.3) erfolgte mit Hilfe des NanoDrop[®]ND 1000 Spektrophotometers der Firma Peqlab.

TE-Puffer (pH 8,0)

Tris	10	mM
EDTA	1	mM

EDTA (pH 8,0)

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	500	mM
---	-----	----

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH eingestellt.

Tris-HCl (pH 8,0)

Tris	1	M
------	---	---

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit HCl eingestellt.

Perchlorat-Lösung (pH 8,0)

NaClO ₄	5	M
--------------------	---	---

EDTA (pH 8,0)

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	500	mM
---	-----	----

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH eingestellt.

STE-Puffer (pH 8,0)

Saccharose	67	g
Tris	50	mM
EDTA	1	mM

Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,5)

K ₂ HPO ₄	50	mM
---------------------------------	----	----

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 50 mM KH₂PO₄ eingestellt.

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

2.7.2.3.1 Aufschluss von *C. acetobutylicum*-Zellen mit der Zelmühle

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit und der schnellen Degradation der RNA erfolgte der Zellausschluss mit Hilfe einer Zelmühle im tiefgekühlten Zustand. Bei der Zelmühle handelt es sich um einen Dismembrator (Mikro-Dismembrator U; Braun Biotech, Melsungen, Deutschland), in welchem eine Chromstahlkugel mit einer hohen Geschwindigkeit in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten PTFE-Zylinder hin und her geschlagen wird, wodurch die im Zylinder befindlichen Proben (Zellen) zu einem feinen Pulver zermahlen werden.

Um RNA aus *C. acetobutylicum*-Zellen zu isolieren, wurden Aliquots von 12 - 40 ml aus dem Kulturgefäß entnommen, sofort mit 0,2 Vol. vorgekühltem Methanol (-20 °C) versetzt und zügig bei -20 °C geerntet (9000 U/min, 5 min). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert.

Für den Aufschluss wurden die Zellpellets in 1 ml TE-Puffer (2.7.2.2) bei 9000 U/min für 5 min gewaschen, um restliches Methanol zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Parallel wurden das Teflongefäß und die Chromstahlkugel in flüssigen Stickstoff gekühlt. Die resuspendierten Zellen wurden anschließend in den mit flüssigem Stickstoff bedeckten PTFE-Zylinder pipettiert, das Gefäß verschlossen und in die Zelmühle eingespannt. Während des Aufschlusses bei 1600 U/min für 3 min wurden die Zellen zu einem weißen gekühlten Zellpulver zermahlen. Dieses wurde vorsichtig in 4 ml RLT-Puffer des RNeasy® Midi Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) welchem zuvor 40 µl Mercaptoethanol zugesetzt wurden, resuspendiert. Der RLT-Puffer ist aufgrund der hohen Konzentration an Guanidiniumhydrochlorid stark proteindenaturierend und durch das enthaltene Mercaptoethanol RNase hemmend. Dadurch konnten die gelösten Zellbestandteile bei Bedarf bei 4 °C über Nacht bis zur RNA-Präparation aufbewahrt werden.

2.7.2.3.2 Aufreinigung von RNA

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

2.7.2.3.3 DNase-Verdau und Qualitätskontrolle der RNA

Um Verunreinigungen der RNA mit Resten chromosomaler DNA zu vermeiden, wurde die zuvor isolierte RNA-Lösung (2.7.2.3.2) einem DNase-Verdau unterzogen. Dazu wurden folgende Komponenten in einen Reaktionsansatz pipettiert.

Reaktionsansatz:

Isolierte RNA	300	µl
5x DNase-Puffer	80	µl
DNase (10 U/µl, Roche, Mannheim, Deutschland)	15	µl
RNase-freies H ₂ O	5	µl

Während einer Inkubation des Ansatzes für 2-3 h bei 28 °C wurde verbliebene DNA durch die DNase degradiert. Danach erfolgte eine Hitze-Inaktivierung der DNase (10 min, 70 °C) sowie eine Überprüfung der RNA auf das Vorhandensein von chromosomaler DNA mit Hilfe einer PCR (2.7.8). Durch spezifisch ausgewählte Primer sollte bei der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung (2.7.5) lediglich ein PCR-Amplifikat aus der mitgeführten Positiv-Kontrolle hervorgehen. Andernfalls musste nochmals ein DNase Verdau mit der Turbo DNase (Ambion, Huntington/Austin, TX, USA) durchgeführt werden.

DNase-Puffer 5x

MgSO ₄	25	mM
Na-Acetat, pH 5,0	500	mM

2.7.2.3.4 Extraktion und Fällung der RNA

Zur Entfernung von unerwünschten Proteinkontaminationen wurde die RNA zur Aufreinigung einer Phenol-Chloroform-Extraktion (2.7.4.1) unterzogen.

Für eine weitere Reinigung und Aufkonzentrierung der RNA erfolgte als nächstes eine Fällung mit Ethanol (2.7.4.2).

Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 min bei 13.000 U/min und 4 °C wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen, wobei darauf zu achten war, dass das transparent bis weiß erscheinende RNA-Pellet nicht durch die Pipette entfernt oder beschädigt wurde. Es folgten zwei Waschriffe mit 1 ml Ethanol (70 % [v/v], reinst, -20 °C) bei 13.000 U/min und -10 °C für je 10 min. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig, möglichst vollständig, von der pelletierten RNA entfernt. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde offen in ein mit

Aluminiumfolie verschlossenem, doppelt autoklaviertem, Becherglas bei einer Temperatur von 37 °C für ca. 15 min getrocknet, bis der Ethanol verdampft war. Die Resuspension des RNA-Pellets erfolgte in 30 µl RNase freiem H₂O für 1-2 Stunden auf Eis. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.7.2.3.5 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA

Die Bestimmung der Konzentration von RNA (2.7.3) erfolgte mit Hilfe des NanoDrop[®]ND 1000 Spektrophotometers der Firma Peqlab.

Eine Überprüfung der Qualität der RNA-Präparationen wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2.7.5) und einer RT-PCR (2.7.8.4) mit spezifischen Primern erreicht.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Nanodrops (NanoDrop[®]ND 1000, Peqlab, Erlangen, Deutschland). Nach der Kalibrierung des Gerätes auf die verwendete Elutionsflüssigkeit wurde 1 µl der zu analysierenden Probe auf die Messoberfläche pipettiert. Durch die Oberflächenspannung entsteht eine Flüssigkeitssäule zwischen den optischen Fasern des Spektralphotometers, die den Messweg darstellt. Des Weiteren konnte die Reinheit der Nukleinsäure anhand des Absorptionsverhältnisses (Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀) bestimmt werden. Für reine DNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8 (Sambrook & Russel, 2001), wobei Verunreinigungen durch Proteine und Phenol anhand einer stärkeren Absorption bei 280 nm zu erkennen sind. Zur Konzentrationsbestimmung von isolierter RNA wurden die Proben 1:10 verdünnt. Bei einem Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 liegt eine RNA-Lösung rein vor.

2.7.4 Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren

2.7.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die meisten Nukleinsäurepräparationen enthalten unerwünschte Proteinkontaminationen. Eine klassische Methode zur Aufreinigung stellt die Phenol-Chloroform-Extraktion dar (Sambrook & Russel, 2001).

DNA-Lösungen wurden mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, [v/v/v]) versetzt und mit einem Vortex beide Phasen gründlich vermischt. Eine Phasentrennung wurde

durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 U/min und RT erreicht werden. Dabei blieben denaturierte Proteine in der Interphase. Anschließend wurde die obere wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um noch vorhandene Phenolreste zu entfernen, erfolgte die Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, [v/v]). Die gereinigten DNA-Lösungen konnten anschließend mit Natriumacetat und Ethanol (2.7.4.2) gefällt werden.

Die Extraktion von RNA erfolgte unter Zugabe von 1 Vol. saurem Phenol. Der Ansatz wurde daraufhin für 10 s mit einem Vortex vermischt und anschließend für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert, wodurch eine deutliche 2-Phasen-Trennung ersichtlich wurde. Die obere, wässrige Phase enthält die gelöste RNA, die denaturierten Proteine hingegen befanden sich in der Interphase. Die obere Phase wurde vorsichtig von der Interphase getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die abermalige Extraktion mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, [v/v]), um noch vorhandene Phenolreste zu entfernen. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 s gevortext, 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert und die entstandene obere Phase in ein neues Eppendorfcup überführt. Um die RNA aufzukonzentrieren erfolgte anschließend eine Fällung mit Ethanol (2.7.4.2).

2.7.4.2 Fällung mit Ethanol

Wässrige Nukleinsäurelösungen wurden mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, -20 °C) versetzt, gründlich gemischt und bei -20 °C über Nacht (alternativ 30 min -70 °C) inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 U/min und 4 °C für 30 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Ethanol (70% [v/v], reinst, -20 °C) gewaschen, anschließend bei 37 °C im Thermoblock getrocknet und in 100 µl sterilem H₂O aufgenommen. Die Lagerung erfolgte entweder bei 4 °C (kurzfristig) oder -20 °C (langfristig).

2.7.4.3 Fällung mit Isopropanol

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 0,7 Vol. Isopropanol versetzt, mehrmals geschwenkt und die gefällte DNA sofort durch Zentrifugation (13000 U/min, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde danach mit 0,5 ml Ethanol (70 % [v/v], reinst, -20 °C) gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 U/min, 10 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurde das DNA-Pellet bei 37 °C für 10-15 min im Thermoblock

luftgetrocknet und anschließend in 100 µl sterilem H₂O aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C (kurzfristig) oder -20 °C (langfristig).

2.7.4.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Mit Hilfe des „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) war es möglich, DNA-Fragmente (PCR-Produkte, Vektor-DNA) für Klonierungen und Sequenzierungen aus Agarosegelen zu isolieren. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in 0,8 - 2 %igen Agarosegelen wurde die zu extrahierende DNA-Bande nach Färbung im Ethidiumbromidbad unter UV-Licht (254 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die Entfernung von Gelrückständen und die Aufreinigung der DNA wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.7.5).

2.7.4.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Um überschüssige dNTPs, Primer, Puffer und Enzymreste, die nachfolgende Reaktionen (Klonierungen, Sequenzierungen) stören können, zu entfernen, wurden die aus PCR-Reaktionen oder einem Enzymverdau hervorgegangenen DNA-Fragmente aufgereinigt. Dazu wurde das „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Aufreinigung wurde analog zu den Angaben des Herstellers durchgeführt mit der Abweichung, dass die Elution der DNA-Fragmente mit sterilem H₂O erfolgte.

2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren zum Zweck der Analyse und Präparation, sowie zur qualitativen und quantitativen Einschätzung erfolgte in hauseigen hergestellten Elektrophoresekammern. In Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente variierte die Agarosekonzentration in 1x TAE-Puffer zwischen 0,8 und 2 % (w/v). Die RNA-Agarosegelelektrophorese erfolgte mit gesondert gereinigten Elektrophoreseutensilien (2.7.1), sowie mit autoklavierter Agarose und Laufpuffer. Um die Lauffront zu markieren und ein möglichst komplettes Einsinken der Proben zu gewährleisten, wurden diese mit einem 6x Auftragspuffer von Fermentas (Waltham, USA) im Verhältnis 5:1 gemischt und in die Taschen gefüllt, die beim Gießen des Gels durch einen Kamm ausgespart wurden. Für eine

Größen- und Mengenabschätzung wurde eine 1 kb-Marker (GeneRuler 1 kb ladder, Fermentas, Waltham, USA) mit einem Größenstandard von 0,25-10 kb benutzt. Um kleinere Fragmente zu visualisieren wurde ein 100 bp-Marker (GeneRuler 100 bp ladder, Fermentas, Waltham, USA) mit einem Größenstandard von 0,1-1 kb verwendet. Das Auftrennen der Nukleinsäurefragmente erfolgte in der Regel bei einer konstanten Spannung von 100 - 120 V unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer. Nach 10- bis 20-minütiger Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (100 µl Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml ad 100 ml H₂O.) konnten die Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 254 nm mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Alphaimager Mini von Protein Simple (Santa Clara, USA) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

50x TAE-Puffer (pH 8,5)

Tris	242	g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	37,2	g
Eisessig	57,1	ml
H ₂ O	ad 1000	ml

2.7.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.7.6.1 Restriktion von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen werden DNA Doppelstränge an spezifischen Stellen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen getrennt, wodurch lineare DNA-Fragmente mit definierten Enden hervorgehen. Die Restriktion erfolgte in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem bei den empfohlenen Temperaturen und mindestens einem Volumen von 10 µl für den Verdau von 1 µg DNA. Die sequenzspezifische Hydrolyse von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten wurde in der Regel 2-14 h, im Falle von chromosomaler DNA für bis zu 24 h bei 37 °C durchgeführt. Bei Mehrfachrestriktionen war darauf zu achten, dass ein Puffersystem verwendet wird in dem alle benötigten Enzyme 50-100 % Aktivität aufweisen. Bei Kontrollrestriktionen wurde die Reaktion durch Zugabe von 6x Loading Dye beendet. Andernfalls erfolgte ein Abstoppen der Reaktion durch Hitzeinaktivierung gemäß den Angaben des Herstellers. Die in dieser Arbeit genutzten Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenzen und Puffer sind in der Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Hersteller	Erkennungssequenz	Puffersystem	Inaktivierung
<i>EcoRV</i> (<i>Eco321</i>)	Fermentas	5'...GAT↓ATC...3' 3'...CTA↑TAG...5'	1x Puffer R; 1x Tango™	80 °C, 20 min
<i>HindIII</i>	NEB	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↑A...5'	1x NEBuffer 2.1	80 °C, 20 min
<i>BsrGI</i>	NEB	5'...T↓GTACA...3' 3'...ACATG↑T...5'	1x NEBuffer 2.1	80 °C, 20 min

2.7.6.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Im Anschluss an die enzymatische Hydrolyse wurde die Vektor-DNA mit einer alkalischen Phosphatase behandelt. Das Enzym entfernt die 5' -Phosphatgruppe von linearer DNA und lässt somit nur noch eine Ligation mit einem nicht dephosphorylierten DNA-Ende zu, wodurch die Ligation des Vektors mit der zu integrierenden DNA begünstigt wird (Sambrook & Russel, 2001). Zum inaktivierten Restriktionsansatz wurden 5 Units der „FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase“ (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gemäß den Herstellerempfehlungen gegeben und dieser für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase erfolgte eine Hitzebehandlung bei 80 °C für 10 min. Um Restaktivitäten des Enzyms zu verhindern, wurde der Ansatz anschließend einer Aufreinigung (2.7.4.5) unterzogen. Zur Überprüfung der Dephosphorylierung, wurde bei der Ligation (2.7.6.3) ein Kontrollansatz ohne Insert mitgeführt.

2.7.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers unter Verwendung der T4-DNA Ligase (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), die unter ATP Verbrauch die von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Gruppen katalysiert. und Berücksichtigung der molekularen Verhältnisse durchgeführt. Um eine effektive Ligation zu gewährleisten wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 oder 1:5 eingesetzt. Das Standardvolumen (5 U/μl) betrug 20 μl. Die T4-DNA-Ligase wurde mit einer Konzentration von 0,1 U/μl im entsprechenden Reaktionspuffer eingesetzt. Der Ligrationsansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert und konnte anschließend direkt für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (2.8.1.2) eingesetzt werden.

2.7.7 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung einzelner PCR-Fragmente und Mutationsereignisse wurden kleine DNA-Fragmente und Plasmidsequenzen bis ca. 1000 bp nach dem Prinzip der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) bei der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Der DNA-Probe von mindestens 100 ng DNA für PCR-Produkte und 1 µg für Plasmide wurden 15 pmol eines Sequenzierprimers hinzugefügt, der den Startpunkt und die Richtung der gewünschten Sequenzierung markierte.

2.7.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987) erfolgte in Thermocyclern der Firmen MWG, Eppendorf und Jena Analytik und wurde im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.7.5) kontrolliert.

2.7.8.1 Primerdesign

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Anhang, Tabelle A15) wurden aus der Sequenz des annotierten Genoms von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Nöling *et al.*, 2001) abgeleitet, um eine hohe Spezifität zu gewährleisten (Altschul *et al.*, 1997). Die Primer wurden so konstruiert, dass nicht mehr als vier gleiche Basen in Folge auftraten, um die die Gefahr einer Fehlhybridisierung durch Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Wenn möglich, wurde auf einen hohen G+C-Gehalt und eine 3'-endständige Lage von Guanin oder Cytosin geachtet. Des Weiteren wurden Primer und Gegenprimer so gewählt, dass die theoretischen Schmelztemperaturen (T_m) möglichst annähernd gleich waren. Diese ließen sich nach folgender Formel berechnen:

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + (0,41 \times \text{G+C \%}) - (650/L) \quad (\text{Chester \& Marshak, 1993})$$

Formel 4: Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur. GC %: prozentualer Gehalt der Basen Guanin und Cytosin; L: Länge in Desoxynukleotiden

2.7.8.2 Standard-PCR

Für PCR-Reaktionen wurde standardmäßig die „Phire® Hot Start II DNA-Polymerase“ von Finnzyme (Vantaa, Finnland) verwendet. Sollten die Amplifikate zur Konstruktion von Deletionsvektoren verwendet werden, wurde die „Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA-

Polymerase“ (Finnzyme, Vantaa, Finnland) eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine DNA-Polymerase mit einer *proof reading*-Funktion, die Amplifikation von fehlerhaften Sequenzen vermeidet.

Phire-PCR-Ansatz

Template-DNA	100	ng
dNTP-Mix (10 mM)	1	μl
Phire DNA-Polymerase	0,5	μl
5 x Phire Puffer	5	μl
Primer forward (5 μM)	2	μl
Primer reverse (5 μM)	2	μl
H ₂ O	ad 25	μl

Phire-PCR-Programm

Denaturierung	98 °C	2 min	} 30x
Denaturierung	98 °C	30 sec	
Annealing	T _m (Primer) -3 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	5 min	
Abkühlen	4 °C	∞	

Phusion-PCR-Ansatz

Template-DNA	100	ng
dNTP-Mix (10 mM)	2	μl
Phusion DNA-Polymerase	1	μl
5 x Phusion Puffer	10	μl
Primer forward (5 μM)	4	μl
Primer reverse (5 μM)	4	μl
H ₂ O	ad 50	μl

Phusion-PCR-Programm

Denaturierung	98 °C	2 min	} 30x
Denaturierung	98 °C	30sec	
Annealing	T _m (Primer) -5 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	10 min	
Abkühlen	4 °C	∞	

Anschließend wurden die Reaktionsprodukte durch Gelelektrophorese (2.7.5) überprüft, aufgereinigt (2.7.4.5) und ihre Konzentration bestimmt (2.7.3). Ergab eine PCR-Reaktion mehrere Banden wurde eine präparative Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion (2.7.4.4) durchgeführt.

2.7.8.3 Kolonie-PCR

Die schnelle Überprüfung einer großen Zahl von *C. acetobutylicum*-Deletionsmutanten oder *E. coli*-Transformanten erfolgte mit Hilfe der Kolonie-PC. Dazu wurde, anstelle einer isolierten Template-DNA, etwas Zellmaterial der zu überprüfenden Klone mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch einen verlängerten initialen Denaturierungsschritt werden die Zellen denaturiert und die intrazelluläre DNA kann in das PCR-Reaktionsgefäß entweichen, um mit den Primern zu hybridisieren.

Kolonie-PCR-Ansatz

dNTP-Mix (25 mM)	0,4	μl
Phire DNA-Polymerase	0,2	μl
5 x Phire Puffer	4	μl
Primer forward (5 μM)	1	μl
Primer reverse (5 μM)	1	μl
H ₂ O	ad 20	μl

Kolonie-PCR-Programm

Denaturierung	98 °C	10 min	} 30x
Denaturierung	98 °C	30 sec	
Annealing	T _m (Primer) -3 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	5 min	
Abkühlen	4 °C	∞	

Die Reaktion wurde gemäß den Herstellerangaben für die oben dargestellte 20 μl Reaktion angesetzt und im Anschluss die Länge der Amplifikate per Agarose-Gelelektrophorese (2.7.5) analysiert.

2.7.8.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA (*complementary DNA*) umzuschreiben und diese in einem zweiten

Schritt, der einer Standard-PCR (2.7.8.2) entspricht, zu einem spezifischen Produkt zu amplifizieren. Die RT-PCR ermöglicht somit einen sensitiven Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte, da ein Amplifikat nur erhalten wurde, wenn die entsprechende mRNA eines Gens im Zuge der Transkription gebildet worden war.

RT-PCR-Ansatz

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

RT-PCR-Programm

Reverse Transkription	50 °C	30 min	
Denaturierung	96 °C	15 min	
Denaturierung	96 °C	30 sec	} 30x
Annealing	T _m (Primer) -3 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	2 min	
Elongation	72 °C	10 min	
Abkühlen	4 °C	∞	

Die reverse Transkription und die anschließende PCR konnten mit dem in dieser Arbeit verwendeten „QIAGEN OneStep RT-PCR Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) in einem Schritt durchgeführt werden. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch überprüft (2.7.5).

2.7.8.5 Quantitative *Real-time* RT-PCR

Die quantitative *Real-time* RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren und damit sehr gut zur Expressionsanalyse einzelner Gene geeignet. Grundlage der *Real-time* RT-PCR sind Farbstoffe oder Fluorophore, deren Einbau in die DNA die Kinetik der Polynukleotid-Synthese durch PCR messbar macht. Die Markierung der DNA erfolgte unter Einsatz des Farbstoffes SYBRTM Green.

Bei der quantitativen *Real-time* RT-PCR wird über das Fluoreszenzsignal indirekt die Zunahme des PCR Produktes gemessen. In den frühen Runden einer PCR Reaktion findet

eine annähernd exponentielle Vermehrung der DNA Fragmente statt, welche später durch die Abnahme von dNTPs, Nachlassen der Enzymaktivität und/oder Anhäufung von Pyrophosphat verlangsamt bzw. gehemmt wird. Die Quantifizierung erfolgt über den sogenannten Ct-Wert („cycle threshold“). Hierbei handelt es sich um die Zykluszahl, bei welcher sich das Fluoreszenzsignal einer Probe das erste Mal signifikant vom Hintergrund abhebt. Anhand einer Standardkurve können definierten Templatemengen C_t -Werte zugewiesen werden. Um im Falle einer Expressionsanalyse den Regulationsfaktor eines Genes unter der Bedingung A im Vergleich zu einer Bedingung B zu ermitteln, ist die Bestimmung der Templatemenge nicht erforderlich. Durch die $\Delta\Delta C_t$ -Formel (Talaat *et al.*, 2002) kann allein über die C_t -Werte eines Gens X unter beiden Bedingungen im Vergleich zu den C_t -Werten eines konstitutiven Gens, ebenfalls unter beiden Bedingungen, der Regulationsfaktor ermittelt werden:

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

mit $\Delta\Delta C_t$ für Gen x = $(C_{t\ x} - C_{t\ \text{konstitutiv}})_{\text{Bedingung I}} - (C_{t\ x} - C_{t\ \text{konstitutiv}})_{\text{Bedingung II}}$

Die Primer für jedes Gen wurden mit einer Länge von 20 - 23 bp und einer Schmelztemperatur von 60 °C generiert und so gewählt, dass die Länge des Produktes der *Real-time* RT-PCR möglichst genau 150 bp beträgt. Sämtliche Arbeiten wurden unter RNase freien Bedingungen durchgeführt. In dieser Arbeit wurde der Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step und das iCycler iQTM Real-time PCR Detection System der Firma BIO-RAD (California, USA) verwendet. Für den Ansatz der *Real-time* RT-PCR wurde zuerst ein Mastermix aus dem Brilliant II Master Mix und dem Enzymmix hergestellt, welcher dann auf die zu testenden RNAs aufgeteilt wurde (Premix). Die Primer wurden in 96-well 0,2 ml Thin-Wall PCR Platten vorgelegt und 20 µl Premix zugegeben. Auf diese Weise wurde mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit die gleiche Konzentration aller Reaktionskomponenten in den einzelnen Ansätzen erreicht.

Real-time RT-PCR-Ansatz

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

Real-time RT-PCR-Programm (iCycler)

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1 Reverse Transkription	50 °C	30 min	1
2 Aktivierung DNA Polymerase	95 °C	13,5 min	1
3 Real-time PCR	94 °C	15 sec	45
	60 °C	30 sec	
	72 °C	30 sec	
4 Finale Elongation	72 °C	1 min	1
5 Bestimmung Schmelzpunkt	55 °C + 0,5 °C Zyklus	10 sec	80
6 Lagerung	4 °C	HOLD	

2.7.8.6 Splicing by overlap extension - PCR (SOE-PCR)

Das Clostron Gene Knockout System (Heap *et al.*, 2007) ist eine Methode, um mit Hilfe eines mobilen Gruppe-II-Introns ein spezifisches Gen dauerhaft und Effizient durch Integration zu inaktivieren (2.9). Um die Erkennungssequenz des Gruppe-II-Introns an das gewünschte Zielgen anzupassen, wurde das Prinzip der splicing by overlap extension-PCR (Ho *et al.*, 1989) angewendet.

Nachdem die Zielsequenz des zu inaktivierenden Gens auf der Internetseite der Entwickler (<http://clostron.com/>) hochgeladen wurde, konnte das computergestützte „Webtool“, basierend auf dem Perutka-Algorithmus (Perutka *et al.*, 2004), mögliche Insertionsstellen für die Geninaktivierung berechnen. Es wird ein statistischer Wahrscheinlichkeitswert für die Effizienz („Score“) einer Insertion an der vorgegebenen Sequenz sowie den Einbau des Introns in *sense*- oder *antisense*-Orientierung angegeben. Das Auswahlkriterium für die Erstellung von Geninaktivierungen waren ein „Score“ von größer als 5,0 und eine möglichst weit im 5'-Bereich des Gens liegende Integronposition.

Im Zuge der SOE-PCR wurden die drei an das Zielgen angepassten Primer (IBS, EBS1d, EBS2) und ein unveränderter Primer (EBS Universal) gemeinsam in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die Oligonukleotide (Anhang, Tabelle A15) wurden zunächst auf die entsprechende Molarität verdünnt und dann zu einem „4-Primer-Mix“ vereinigt:

„4-Primer-Mix“

IBS Primer (100 µM)	2	µl
EBS1d Primer (100 µM)	2,5	µl
EBS2 Primer (20 µM)	12,5	µl
EBS Universal (20 µM)	0,25	µl
H ₂ O	ad 20	µl

Die Primer IBS und EBS1d waren bei dieser PCR 5fach höher konzentriert, als der EBS2 und der nicht modifizierte EBS Universal Primer. Dies ist damit zu begründen, dass EBS2 und EBS Universal die unvollständigen 100 bp und 200 bp Fragmente herstellten, welche daraufhin als Template für die äußeren Oligonukleotide (IBS und EBS1d) dienten. Dadurch konnte vermehrt das genspezifische 350-bp-Fragment amplifiziert werden.

SOE-PCR-Ansatz

Intron PCR-Template (1:10)	1	μl
dNTP-Mix (10 mM)	2	μl
Phusion DNA-Polymerase	1	μl
5 x Phusion Puffer	10	μl
„4-Primer-Mix“	2	μl
H ₂ O	ad 50	μl

SOE-PCR-Programm

Denaturierung	94 °C	30 sec	} 30x
Denaturierung	94 °C	15 sec	
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	2 min	
Abkühlen	4 °C	∞	

Die Amplifikation erfolgte nach dem oben dargestellten Schema. Anschließend erfolgte nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (2.7.5) eine Aufreinigung des 350bp-Fragmentes aus dem Gel (2.7.4.5).

2.7.9 DNA-DNA Hybridisierung mittels Southern Blot

Der Southern Blot (Southern, 1975) ist ein Kappilarblotverfahren, bei dem ihrer Länge nach gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf einer Nylonmembran fixiert werden, um später durch Hybridisierung mit einer DNA-Sonde, die aus speziell markierten Nukleinsäuren besteht, ganz spezifisch Gensequenzen nachweisen zu können.

Die Southern-Hybridisierung wurde in dieser Arbeit als abschließende Verifizierungsmethode von ClosTron-Insertionsmutanten verwendet.

2.7.9.1 Sondenherstellung

Die Markierung der, für die Detektion von DNA-Fragmenten bei der Southern-Hybridisierung, verwendeten Sonden erfolgte entsprechend der Herstellerangaben des Biotin DecaLabi DNA Labeling Kits (Thermo Scientific, Waltham, USA). Dabei wurde die Sonde durch den Einbau von Desoxyuridin-Nukleotiden (dUTPs) mit kovalent gebundenem Biotin markiert. Die Synthese des neuen DNA-Strangs wurde durch das Klenowfragment der DNA-Polymerase I unter Verwendung von dekameren „random“-Primern ermöglicht. Als Matrize für die Markierungsreaktion dienten über eine präparative Gelelektrophorese (2.7.4.4) isolierte PCR-Produkte, deren Größe zwischen 700 und 900 bp lag. Die Menge an DNA im Markierungsansatz betrug 500 - 1000 ng. Der Ansatz wurde für ca. 20 h bei 37 °C inkubiert und dann die Reaktion durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.7.9.2 Vorbereitung und Blotten der Probe

Für den Southern Blot wurde genomische DNA aus *C. acetobutylicum* sowie der zu verifizierenden ClosTron-Insertionsmutante isoliert (2.7.2.2) und ca. 2 µg über Nacht mit einem Restriktionsenzym hydrolysiert (2.7.6.1). Bei der Wahl des Restriktionsenzym war darauf zu achten, dass es nicht innerhalb der Sonde oder des Introns, aber in der Nähe des zu überprüfenden Gens schneidet, damit eine Größenveränderung später auf dem Blot sichtbar wird. Nach einer Überprüfung der hydrolysierten DNA durch eine analytische Gelelektrophorese (2.7.5) folgte die langsame Auftrennung des gesamten restlichen Ansatzes in einem 0,8 %igen Agarosegel bei 80 V für 2 h. Zur späteren Größenermittlung wurde ein Biotin-markierter Größenstandard (NEB, Frankfurt Main, Deutschland) in den äußeren Geltaschen mitaufgetrennt.

Beim anschließenden Blotting wird die denaturierte DNA durch vertikale Kapillarkräfte aus dem Agarosegel auf eine für Makromoleküle undurchlässige Membran transferiert. Dazu wurde zunächst eine in H₂O eingeweichte Nylonmembran (Roche, Mannheim, Deutschland), deren Größe auf die des Agarosegels zugeschnittene war, auf einen Vakuumblotter (BIO-RAD, California, USA) positioniert. Auf die Nylonmembran wurde die Blotting-Maske gelegt die die Membran an jeder Seite mit einem ca. 1 cm breiten Rand überdeckte. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei mit der oberen Seite nach unten auf die Maske positioniert und ein Vakuum angelegt (7 mmHg). Das Gel wurde nun für 10 min in 250 mM HCl gewaschen, um Strangbrüche zu erzeugen und so den Transfer der DNA zu erleichtern. Nach zwei kurzen

Waschschritten mit H₂O erfolgten zwei Denaturierungsschritte mit Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) für jeweils 15 min. Im Anschluss an zwei weitere Waschschritte mit H₂O wurde zur Neutralisierung das Gel zweimal für je 15 min mit Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl pH 7,5) übergossen. Nach einem weiteren Waschschritt mit H₂O wurde die DNA durch den 20x SSC Transferpuffer (3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat) 45-60 min auf die Membran übertragen. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers der DNA auf die Membran wurde das Gel im Ethidiumbromidbad angefärbt. Danach wurde die Nylonmembran kurz mit H₂O gespült und für 1 min mit UV Licht ($\lambda = 302$ nm) bestrahlt, um die DNA mittels „cross-linking“ kovalent zu fixieren. Abschließend erfolgte ein Trocknen der Membran in Whatman Papier von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland).

2.7.9.3 Hybridisierung

Um das unspezifische Binden der Sonde an die Membran zu verhindern, erfolgte vor der eigentlichen Hybridisierung eine Prähybridisierung. Dazu wurde die Nylonmembran vorsichtig mit einer Pinzette in ein verschraubbares Glasröhrchen überführt und mit 25 ml Prähybridisierungslösung (= sondenfreie Hybridisierungslösung) für 2 h bei 42 °C in einem Hybridisierungsofen von Techne (Hybridiser HB-1, Duxford, UK) inkubiert. Die Biotin-markierte Sonde (2.7.9.1) wurde für 5 min bei 100 °C hitzedenaturiert, zur Prähybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 42 °C mit der Membran hybridisiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Waschschritt in Puffer 1 (2 x 15 min, RT) und Puffer2 (2 x 15 min, 60 °C). Abschließend wurde die Membran Whatman Papier (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) getrocknet.

Hybridisierungslösung

20 x SSC	25	% (v/v)
Blocking Stammlösung (10%)	10	% (v/v)
N-Laurylsarcosin (10%)	1	% (v/v)
SDS (10%)	0,2	% (v/v)
H ₂ O	ad 50	µl

Maleinsäure-Puffer (pH 7,5; autoklaviert)

Maleinsäure	1	M
NaCl	1,5	M

Blocking Stammlösung

Blocking Reagent (Roche, Mannheim)	10	g
Maleinsäure-Puffer	ad 100	ml

Puffer 1

20 x SSC	10	% (v/v)
SDS (10%)	0,1	% (v/v)

Puffer 2

20 x SSC	0,5	% (v/v)
SDS (10%)	0,1	% (v/v)

2.7.9.4 Detektion Biotin-markierter DNA

Die Detektion der Biotin-markierte DNA erfolgte mit dem Biotin Chromogenic Detection Kit von Thermo Scientific (Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip beruht hierbei auf einem Immunoassay durch 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT). Das zur Markierung der Sonde verwendete Biotin dient dabei als Antigen für einen mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelten Antikörper, dem Streptavidin. NBT und BCIP fungieren als Substrate der alkalischen Phosphatase und werden zu Diformazan und Indigo, einem blauvioletten Farbkomplex, umgesetzt wodurch die an die Sonde gebundenen DNA-Fragmente sichtbar werden. Anschließend wurde die Membran mit H₂O gewaschen um die die Farbreaktion abzustoppen, zur Digitalisierung eingescannt und dann lichtgeschützt in Whatman Papier aufbewahrt.

2.8 Erzeugung rekombinanter Organismen**2.8.1 DNA Transfer in *E. coli*****2.8.1.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen**

Für den Transfer von DNA mittels Hitzeschockverfahren (Sambrook & Russel, 2001) wurden chemisch kompetente *E.coli*-Zellen verwendet, deren Herstellung modifiziert nach einer Methode von Lederberg (Lederberg & Cohen, 1974) erfolgte.

Zunächst wurde der *E. coli*-Akzeptorstamm (2.2) auf einer LB-Platte (2.3.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde anschließend in 5 ml LB-Medium überführt und wiederum über Nacht bei 37 °C und 180 U/min kultiviert. Diese

Vorkultur wurde als Inokulum für die Hauptkultur (1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane, 100 ml LB-Medium) verwendet. Mit dem Erreichen einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend geerntet (4000 U/min, 5min, 4 °C). Das Zellsediment wurde in 50 ml einer eiskalten $CaCl_2$ -Lösung (100 mM) vorsichtig resuspendiert und weitere 30 min auf Eis inkubiert, bevor ein zweiter Zentrifugationsschritt (4000 U/min, 5min, 4 °C) folgte. Danach wurden die Zellen in 10 ml der eiskalten $CaCl_2$ -Lösung (100 mM) resuspendiert, mit 2 ml 80 %igem Glycerin gemischt und nochmals für 5 min auf Eis gestellt. Aliquots von 100 μ l wurden in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen konnten bei -80 °C ohne eine Verschlechterung der Transformationseffizienz bis zur Verwendung gelagert werden.

2.8.1.2 $CaCl_2$ -vermittelte Transformation in *E. coli*

Zur Transformation wurde ein 100- μ l-Aliquot der chemisch kompetenten Zellen schonen auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz (2.7.6.3) oder 150 - 400 ng Plasmid-DNA versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis mit anschließendem Hitzeschock in einem Thermoblock bei 42 °C für 90 sec. Nachdem die Zellen erneut für 3 min auf Eis inkubiert wurden, wurde 1 ml LB-Medium (2.3.1) zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, damit der vektorkodierte Marker exprimiert werden konnte. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 50000 U/min wurden 800 μ l Überstand abgenommen, das Sediment im Rest gelöst und auf LB-Platten mit den für die Selektion erforderlichen Zusätzen (Tabelle 2.5) ausplattiert. Die erfolgreiche Transformation wurde durch Überimpfen einer Einzelkolonie in 5-ml-Kulturen und anschließender Plasmid-Minipräparation (2.7.2.1) überprüft.

2.8.2 DNA Transfer in *C. acetobutylicum*

2.8.2.1 Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation

Für die Elektrotransformation wurde eine gut wachsende Übernacht-Kultur von *C. acetobutylicum* genutzt, um 50 ml vorgewärmtes CG-Medium (2.3.2) auf eine OD_{600} von 0,1 anzuimpfen. Nach einer Inkubation für ca. 5 h bei 37 °C (OD_{600} von 0,7 - 1,0) wurde die Kultur in das Anaerobenzelt eingeschleust. Die nachfolgenden Schritte wurden, mit Ausnahme der Zentrifugationen, in der sauerstofffreien Atmosphäre des Anaerobenzeltes und auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 U/min und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Zellen vorsichtig in 30 ml

kaltem anaeroben ETM-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5000 U/min, 4 °C, 10 min) wurde das Zellpellet in 3 ml ET-Puffer aufgenommen und je 600 µl der elektrokompenten Zellen in eine sterile, auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (Lückenweite 0,4 cm) überführt, in die bereits zuvor 2 - 10 µg Plasmid-DNA vorgelegt worden war. Um eine Degradation der eingesetzten DNA zu unterbinden, erfolgte vor der Elektrotransformation in *C. acetobutylicum* eine *in vivo* Methylierung der genspezifisch angepassten pMTL007C-E2 Plasmide in *E.coli* 2275 (2.8.1.2). Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1,8 kV, einem Widerstand von 600 Ω und einer Kapazität von 50 µF, wodurch eine Zeitkonstante τ von 6 - 10 ms erreicht wurde. Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen in 3 ml CG-Medium gegeben und zur Regeneration 4 - 5 h bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte das Ausplattieren von 200 µl Zellsuspension auf selektiven CGM-Agarplatten, die im Anaerobentopf bei 37 °C für 1 bis 2 Tage in der inkubiert wurden.

ETM-Puffer (pH 6,0)

Saccharose	27,7	g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	32	mg
NaH ₂ PO ₄	158	mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	12,8	g
H ₂ O	ad 300	ml

ET-Puffer (pH 6,0)

Saccharose	27,7	g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	32	mg
NaH ₂ PO ₄	158	mg
H ₂ O	ad 300	ml

2.9 ClosTron Gene Knockout System

2.9.1 Erzeugung genspezifischer pMTL007C-E2 Vektoren

Vorbereitend wurde die Intron-DNA (350-bp-Fragment) mit der SOE-PCR (2.7.8.6) und den genspezifisch Oligonukleotiden (Anhang, Tabelle A15) an das Zielgen angepasst. Bevor das modifizierte Intron in den für das ClosTron-System verwendeten Vektor pMTL007C-E2 kloniert werden konnten, mussten sowohl das Plasmid als auch das 350-bp-Fragment einem doppelten Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Bsr*GI (siehe Tabelle 2.8) unterzogen werden um kohäsive Enden zu generieren. Diese Restriktionsenzyme konnten genutzt werden, da bei

der Amplifikation der Intron-DNA durch Verwendung der Primer IBS und EBS1d enzymespezifische Schnittstellen eingefügt wurden. Es wurden ca. 300 ng PCR-Produkt bzw. bis zu 2 µg Vektor in einem 50 µl-Ansatz mit 20 U der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *BsrGI* unter Verwendung des NEBuffer 2 für 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80 °C für 20 min. Um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden wurde dieser anschließend einer Phosphatasebehandlung (2.7.6.2) unterzogen. Nach einer Kontrolle der Restriktionsspaltung erfolgte eine Extraktion (2.7.4.4) und Aufreinigung (2.7.4.5) aus dem Agarosegel. Im Folgenden wurde das ClosTron PCR-Fragment mit dem vorbereiteten linearisierten Vektor ligiert (2.7.6.3).

2.9.2 Transformation der ClosTron Plasmide in *E. coli*

Nach der Ligation wurden der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (2.8.1) und auf selektiven Agar-Platten mit Chloramphenicol (Tabelle 2.5) ausplattiert. Der Vektor pMTL007C-E2 codiert das *catP*-Gen, dessen Produkt, eine Chloramphenicolacetyltransferase, zur Inaktivierung von Chloramphenicol befähigt ist. Dadurch ist es solchen Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, möglich auf diesen Selektionsplatten zu wachsen. Da es bei der Restriktion des pMTL007C-E2-Vektors zu einem Verlust des *lacZ*alpha-Gens kommt, konnte mittels Blau-Weiß-Screening auf ein zweites Merkmal selektiert werden. Bei einer erfolgreichen Ligation bleibt die Synthese der β -Galaktosidase aus wodurch das Chromogen (X-Gal) nicht mehr zu einem blauen Farbstoff umgesetzt werden kann. Die dadurch bedingten weißen Kolonien wurden gepickt, zur Überprüfung einer Kontrollrestriktion mit *HindIII* und *BsrGI* unterzogen und anschließend sequenziert (2.7.7).

2.9.3 Transformation der ClosTron Plasmide in *C. acetobutylicum*

Um rekombinanten Plasmide in *C. acetobutylicum* transformieren zu können, mussten diese zuvor methyliert werden. Grund dafür ist die Restriktionsendonuklease *Cac824I* mit der Erkennungssequenz 5'-GCNGC-3', die den Organismus vor Fremd-DNA schützt und diese abbaut. Daher erfolgte zunächst eine Transformation des genspezifischen pMTL007C-E2-Vektors in *E. coli* 2275 (2.8.1.2). Dieser Stamm enthält ein pAN-2 Plasmid, welches eine Tetracyclinresistenz vermittelt und die Φ 3T I Methyltransferase des *Bacillus subtilis* Phagen Φ 3T (Mermelstein & Papoutsakis, 1993) exprimiert, die dieselbe Sequenzspezifität wie die DNA-Methylase aus *C. acetobutylicum* besitzt. Somit wird das Plasmid in *E. coli* *in vivo*

methyliert und so vor der Degradation durch *C. acetobutylicum* geschützt. Im Anschluss an die Transformation in *E. coli* ER2275 erfolgte die Selektion auf LB-Agar mit Tetracyclin (10 µg/ml) und Chloramphenicol (25 µg/ml). Nach ca. 24 h wurden Einzelkolonien in 5-ml-Kulturen mit Antibiotikazusatz überimpfte und anschließend mittels Plasmid-Minipräparation (2.7.2.1) und analytischer Gelelektrophorese (2.7.5) überprüft.

Nach der *in vivo* Methylierung konnten die genspezifischen Clostron Plasmide in elektrokompente *C. acetobutylicum*-Zellen transformiert werden (2.8.2.1). Nach einer Inkubation von bis zu 2 Tagen auf CGM-Platten mit Thiamphenicol (15 µg/µl) wurden Einzelkolonien gepickt und auf CG-Agar mit Erythromycin (10 µg/µl) ausgestrichen. Die Selektion beruht darauf, dass nach korrekter Insertion des Gruppe II Introns der Marker ErmRAM aktiv und somit Erythromycinresistenz vermittelt wird.

2.9.4 Nachweis der Insertion

Da auf CG-Agar mit Erythromycin (10 µg/µl) gewachsene Kolonien nur einen Hinweis auf die Integration des Gruppe-II-Introns in das Genom, nicht aber einen Nachweis für die erfolgreiche Insertion in das Zielgen liefern, erfolgte eine Verifizierung über PCR-Amplifikationen sowie DNA-Hybridisierung.

2.9.4.1 Integrationsnachweis mittels PCR

Die schnelle Überprüfung einer großen Zahl von potentiell positiven Klonen erfolgte mit Hilfe der Kolonie-PC (2.7.8.3), wobei es, wie in Abbildung 2.5 dargestellt, folgende Möglichkeiten bei der Wahl der Oligonukleotide (Anhang, Tabelle A15) gab.

Bei der sogenannten Gen-Intron-PCR wurden ein Intron- (pMTL007C-E2) und ein Genspezifischer Primer verwendet. Es konnte demnach nur ein Fragment amplifiziert werden, wenn sich das Intron im Zielgen befand. Die Wahl der Primer war abhängig davon, ob eine Integration in den „sense“- bzw. „antisense“-Strang erfolgte. Da die Insertionsmutanten aus dieser Arbeit alle in „sense“ orientiert waren, wurden stets der pMTL007C-E2_Rev sowie der Fwd-Primer des entsprechenden Gens verwendet. Bei der zweiten Möglichkeit, der Gen-Gen PCR, konnte bei einer erfolgreichen Integration ein um das Gruppe-II-Intron (1849 bp) vergrößertes Fragment amplifiziert werden. In einer dritten PCR wird das „RAM-splicing“ im Zuge der Retrotransposition überprüft. Mit Hilfe der Primer ErmRAM_Fwd und ErmRAM_Rev konnte ein 900 bp großes Fragment in Gegenwart des gespleißten und somit integrierten RAM amplifiziert werden. Lag das Gruppe-I-Intron noch vor wurde ein Fragment

der Größe 1300 bp erhalten. Die Oligonukleotidpaare wurden so gewählt, dass im Falle einer erfolglosen Insertion ein 300-400 bp großes PCR-Produkt erhalten wurde.

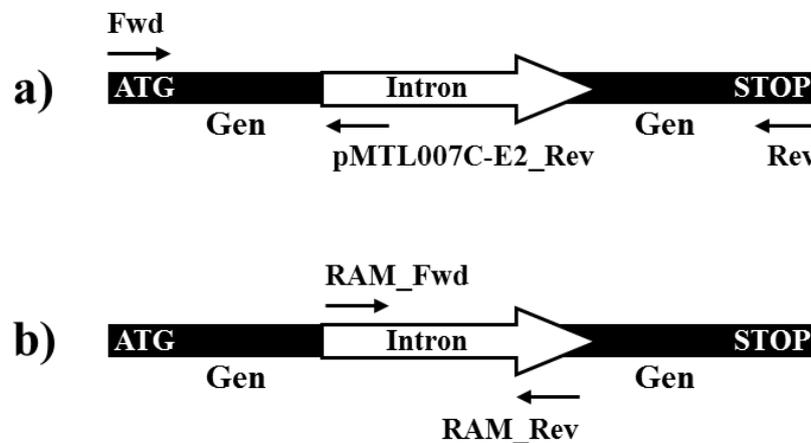


Abbildung 2.5: Schema zur Verifizierung der genspezifischen Integration des Gruppe-II-Introns. Der Pfeil (weiß) stellt das Gruppe-II-Intron im Zielgen (schwarz) dar. Die schwarzen kleinen Pfeile repräsentieren die relativen Bindestellen der Oligonukleotide. Gezeigt ist die Intron-Insertion in „sense“-Orientierung. **a)** Bei der Gen-PCR werden die Gen-Primer (Fwd und Rev), bei der Gen-Intron-PCR der Fwd- sowie der Intron-spezifische Primer pMTL007C-E2_Rev eingesetzt. **b)** Überprüfung des „RAM“-„splicing“ im Zuge der Retrotransposition mit Hilfe der Primer ErmRAM_Fwd und ErmRAM_Rev.

2.9.4.2 Integrationsnachweis mittels Southern-Hybridisierung

Die endgültige Bestätigung der mittels Kolonie-PCR detektierten positiven Klone erfolgte mittels Southern Blot (2.7.9). Mit zuvor durchgeführten *in silico* Analysen wurden Restriktionsenzyme gesucht, deren Erkennungssequenz in der unmittelbaren Umgebung des jeweiligen Zielgens lagen und im Gen sowie im Gruppe-II-Intron selbst keine Schnittstelle besaßen. Um die Banden zu detektieren wurde eine Intron-spezifische Sonde verwendet. Somit konnte einerseits die Insertion im gewünschten Zielgen nachgewiesen und andererseits überprüft werden, ob eine weitere Integration irgendwo im Genom erfolgte (Lambowitz & Zimmerly, 2011). Die Herstellung der Sonde erfolgte wie unter 2.7.9.1 beschrieben.

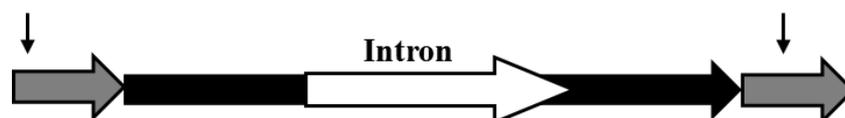


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung zum Nachweis mittels Southern-Hybridisierung. Der Pfeil (weiß) stellt das Gruppe-II-Intron im Zielgen (schwarz) dar. Die schwarzen kleinen Pfeile repräsentieren die möglichen Restriktionsschnittstellen in der Umgebung des Zielgens. Die umliegenden Gene sind grau dargestellt.

2.10 Hybridisierung und Auswertung von DNA-Microarrays

Die Genexpressionsanalyse dient der Untersuchung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung zellulärer mRNA, wofür typischerweise die relativen Expressionsstärken zweier Proben miteinander verglichen werden. DNA-Microarrays erlauben, im Gegensatz zu den anderen, in einem Experiment simultan die Expressionsunterschiede von mehreren tausend Genen zu bestimmen.

Die für die Hybridisierung verwendete RNA („target“) wird mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und dabei mit den fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert („Labeling“). Die Verwendung von Fluoreszenz ermöglicht das Auswerten von zwei oder mehreren verschiedenen Signalen in einem Experiment. Durch die Spezifität der Basenpaarung von Nukleinsäuren binden die markierten cDNA-Moleküle an die immobilisierten Nukleinsäuresequenzen („probes“) auf der Oberfläche des DNA-Microarrays. Da die Spektren für Anregung und Emission beider Farbstoffe weit auseinanderliegen können sie nach Hybridisierung der „probes“ mit den „targets“ auf demselben Array getrennt mit Hilfe eines Laserscanners detektiert werden. Die Bestimmung des Verhältnisses der Signalintensitäten der unterschiedlich markierten Proben an einem Sondenlocus (Spot) erlaubt die Messung der ursprünglich vorhandenen RNA-Mengenverhältnisse des transkribierten Gens. Da die Fluoreszenzsignale u.a. von der Einbauhäufigkeit der Farbstoff-verlinkten Nukleotide beim Umschreiben der mRNA in cDNA und der Lage zueinander abhängen, geben DNA-Microarrays jedoch keine Informationen über die absoluten Expressionsstärken in den untersuchten Proben.

2.10.1 Markierung von RNA mit Cy3/Cy5 Fluoreszenzfarbstoffen

Die Markierung der isolierten RNA (2.7.2.3) erfolgte über eine reverse Transkription unter Verwendung von „random hexamer“ Primern (Roche, Mannheim, Deutschland), Cy3- und Cy5-markierten Nukleotiden (GE Healthcare, München, Deutschland), einem 4/10 dNTP-Nukleotid-Mix (Roche, Mannheim, Deutschland) und dem SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Für die Genexpressionsanalyse von zwei miteinander zu vergleichenden Proben wurden jeweils 2 Microarray-Experimente mit gegenläufiger Cy3-/Cy5-Farbstoffmarkierung vorgenommen. Dabei ist der sogenannte „Dye Flip“ die Wiederholung eines „Labeling“-Experiments mit umgekehrter Markierung der eingesetzten RNA-Isolate. Die Cyanin-Farbstoffe Cy3 und Cy5 werden mit unterschiedlicher

Effizienz in die erzeugten cDNA-Fragmente eingebaut. Somit ermöglicht der „Dye Flip“, die in der Markierungsreaktion auftretenden systematischen Fehler zu kompensieren.

Zu Beginn erfolgte das Annealing der „random hexamer“ Primer an die RNA. Dazu wurden jeweils zwei Ansätze á 25 µg RNA (2 x Referenz- und 2 x Experimentalprobe) wie folgt auf Eis pipettiert:

Annealing-Ansatz

RNA	25	µg
Random hexamere (5 µg/µl)	3	µl
H ₂ O (RNase-frei)	ad 10	µl

Die einzelnen Komponenten wurden gut vermischt, kurz zentrifugiert, für 10 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis abgestoppt. Dann wurden dem Ansatz für die reverse Transkription die unten aufgeführten Komponenten der Reihe nach zugeben. Da die Cyanin-Farbstoffe Cy3 und Cy5 stark lichtempfindlich sind, galt es die Reaktionsansätze ab dem Zeitpunkt der Zugabe stets entsprechend zu schützen.

Ansatz Reverse Transkription

5 x first strand buffer	4	µl
0,1 M DTT	2	µl
4/10 dCTP-Mix	2	µl
dCTP Cy5-markierte Nukleotide (Cy3 oder Cy5)	1	µl
SuperScript® III Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1	µl

Der Reaktionsansatz wurde vermischt, kurz zentrifugiert und für 3-4 Stunden bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Um verbliebende Template RNA und nicht eingebauten Farbstoff zu entfernen, erfolgte anschließend eine Aufreinigung der markierten cDNA. Zunächst wurde die RNA durch die Zugabe von 2 µl 2,5 M NaOH und einer Inkubation des Ansatzes bei 37 °C im Thermocycler in kurze Oligomere hydrolysiert. Die Reaktion wurde anschließend mit Hilfe von 10 µl 2 M HEPES neutralisiert. Für die folgenden Schritte wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) eingesetzt. Hierbei wurde jeder Markierungsansatz zusammen mit 500 µl PB-Puffer auf je eine QIAquick-Säule gegeben, vorsichtig vermischt und anschließend abzentrifugiert (13000 U/min, 1 min). Die Säulenmembran wurde nun 2x mit PE-Puffer gewaschen (13000 U/min, 1 min) und in einer weiteren Zentrifugation für 1 min bei 13000 U/min getrocknet. Nachdem die Membran in ein neues steriles 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt wurde, erfolgte die Elution der markierten

cDNA durch Zugabe von 35 µl EB-Puffer. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert, bevor sich eine Zentrifugation für 2 min bei 13000 U/min anschloss. Die Eluate mit der markierten cDNA wurden bis zur Hybridisierung lichtgeschützt auf Eis oder bei -80 °C gelagert.

2.10.2 Hybridisierung der *probes* mit markierter *target*-cDNA

Die Hybridisierung der „*probes*“ mit der markierten „*target*“-cDNA erfolgte vollautomatisch unter Verwendung der Tecan Hybridization Station HS400Pro. Vorbereitend wurden pro Fluoreszenzfarbstoff 80-100 pmol der markierter cDNA in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, die „*target*“-cDNA für 5 min bei 100 °C denaturiert und sofort im Anschluss auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 150 µl mit Tom-Freeman-Hybridisierungspuffer (Fitzpatrick *et al.*, 2005) aufgefüllt.

Tom-Freeman-Hybridisierungspuffer

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

Lösung sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20 °C lagern

Der Microarray mit den darauf befindlichen „*probes*“ wurde in eine der insgesamt 4 vorhandenen Hybridisierungskammern der Tecan Hybridization Station HS400Pro eingespannt, das unten aufgeführte Programm zur Hybridisierung gestartet und die Proben im Zuge der „*Sample Injection*“ mit einer Pipette in die vorgesehene Kammer injiziert.

1	Wash	Temp. °C: 45,0; First: YES; Ch.: 4; Runs: 1; Wash time: 0:00:30; Soak time: 0:00:00
2	Sample Injection	Temp. °C: 45,0; Agitation: YES; BCR: NO
3	Hybridization	Temp. °C: 45,0; Agitation Frequency: Low; High Viscosity Mode: NO; Time: 15:00:00
4	Wash	Temp. °C: 25,0; First: NO; Ch.: 3; Runs: 1; Wash time: 0:02:30; Soak time: 0:00:30
5	Wash	Temp. °C: 25,0; First: NO; Ch.: 3; Runs: 1; Wash time: 0:01:10; Soak

	time: 0:00:00
6 Wash	Temp. °C: 25,0; First: NO; Ch.: 4; Runs: 3; Wash time: 0:01:10; Soak time: 0:00:00
7 Slide Drying	Temp. °C: 30,0; Time: 0:02:00, Final Cleaning: YES, Ch.:1

Lösungen:Channel 1: H₂O

Channel 3: 1 x SSC/0,2 % SDS

Channel 4: 0,1 x SSC

2.10.3 Quantifizierung der Microarray-Daten

Die Detektion und Analyse der Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe erfolgte mit Hilfe des Scanners GenePix 400B (AXON Instruments, Union City, USA) und der Software „GenePix Pro 6.0“ (MDS Analytical Technologies, Ismaning, Deutschland). Eine erste Normalisierung der Arraydaten erfolgte anhand eines „preview scan.“ Dabei wurde die Scanstärke (PMT (Photomultiplier-tube) 635 nm – Cy5, PMT 532 nm – Cy3) für die beiden Farbstoffe anhand der Fluoreszenz von Spots für Haushaltsgenen („housekeeping genes“) ermittelt, da bei diesen Genen die Fluoreszenzintensität ein Verhältnis von 1:1 ergeben sollte. Anschließend erfolgte der Hauptscan mit folgenden Einstellungen:

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

Für die Quantifizierung der Fluoreszenzwerte jedes einzelnen Spots wurde zunächst mit der Software „GenePix Pro 6.0“ eine Rasterschablone bzw. Maske über den Chip gelegt, wodurch für jeden Spot eine Zuordnung der korrespondierenden Annotation erfolgte und der auszuwertende Bereich festgelegt wurde. Die Ausrichtung der Schablone wurde für jeden einzelnen Spot manuell überprüft. Anhand eines eigens dafür entwickelten Computerprogramms (Ehrenreich, unveröffentlicht) konnte die Maske, basierende auf einer Excel-Belegungsliste (Microsoft, Redmond, USA), in Form eines „gal files“ gefertigt werden. Die Berechnung der Fluoreszenzwerte, des Hintergrunds und der Standardabweichung des Hintergrunds für beide Farbstoffe, sowie des „Ratio of Medians“, „Ratio of Means“ und dem

„Regression Ratio“ erfolgte für jeden Spot automatisch durch das Programm GenePix Pro. Bei dem „Ratio of Medians“, „Ratio of Means“ und dem „Regression Ratio“ handelt es sich um jeweils unterschiedliche mathematische Ansätze zur Ermittlung des mittleren Expressionswertes eines Spots.

Die Ergebnisse konnten in Form eines Datenfiles und eines „Scatterplots“ eingesehen werden. Für eine weitere Normalisierung der Daten wurde im „Scatterplot“ die Hauptwolke der Gene auf die Winkelhalbierende gelegt, also in den Bereich eines Regulationsfaktors von 1. Eine logarithmische Auftragung der Expressionswerte vereinfacht dieses Verfahren zusätzlich, da Spots mit einem Expressionsfaktor von annähernd 1 gestaucht werden und sich die Dichte der Hauptwolke der Daten erhöht. Zur weiteren Bearbeitung und Analyse der normalisierten Transkriptionsdaten wurden diese in ein Excel File exportiert.

2.10.4 Analyse der Transkriptionsdaten

Die in ein Excel File importierten normalisierten Transkriptionsdaten wurden alle dahingehend gefiltert, dass die Fluoreszenzsignale für Rot und Grün selbst, und nach Abzug der Standardabweichung des Hintergrunds („background – B“) einen Wert größer Null besaßen. Mit Hilfe der Software „GenePix Pro 6.0“ (MDS Analytical Technologies, Ismaning, Deutschland) wurde das mittlere Fluoreszenzverhältnis eines „spots“ als geometrisches („Ratio of Medians“) und arithmetisches („Ratio of Means“) Mittel berechnet. Zur Berechnung des „Regression Ratios“ wurde das Verhältnis der beiden Wellenlängen (635 nm/ 532 nm) zueinander mittels linearer Regression ermittelt. Da die geschilderten Fluoreszenzverhältnisse unterschiedlich sensitiv auf verschiedene Fehlerquellen sind, wurden als nächstes Filterkriterium nur Datensätze verwendet, bei denen das berechnete mittlere Expressionsverhältnis für einen Spot nicht mehr als 30 % Abweichung voneinander aufwies.

Im Anschluss an die Evaluation der Daten wurden alle ORFs deren Expression sich unter den jeweiligen Bedingungen um einen Faktor 3 änderten herausgefiltert und hinsichtlich ihrer Funktion im Stoffwechsel beurteilt. Dieser Schwellenwert wurde gewählt, um das Expressionsverhältnis eines Gens als signifikant hochreguliert ($\geq 3,0$) oder reprimiert ($\leq - 3,0$) definieren zu können.

3. Ergebnisse

3.1 „ClosTron Gene Knockout System“

Wie einleitend erwähnt, zeichnet sich *C. acetobutylicum* durch einen komplexen Stoffwechsel aus, dessen physiologische und regulatorische Mechanismen, bedingt durch eine lange genetische Unzugänglichkeit, nach wie vor größtenteils unaufgeklärt sind. Mit der Sequenzierung des kompletten Genoms von *C. acetobutylicum* im Jahre 2001 (Nölling *et al.*, 2001) und der dadurch vorliegenden Sequenzinformation ließ sich 2007 das „ClosTron Gene Knockout System“ (Heap *et al.*, 2007) als neue Technologie zur gezielten Mutagenese für die Gattung *Clostridia* etablieren.

Die Grundlage des ClosTron-Systems bildet das L1.ltrB Gruppe-II-Intron aus *Lactococcus lactis*. Gruppe-II-Introns sind in Prokaryoten und Organellen von Eukaryoten weit verbreitete mobile RNA-Elemente, die sich selbst über einen als „Retrohoming“ bezeichneten Mechanismus in Protein- und RNA-kodierende Gene integrieren (Frazier *et al.*, 2003; Lambowitz & Zimmerly, 2011; Yao *et al.*, 2005). Sie enthalten einen offenen Leserahmen, der für ein Intron-Encoded Protein (IEP) kodiert, welches eine Reverse Transkriptase-, DNA Endonuklease- und RNA Splicing-Aktivität besitzt (Matsuura *et al.*, 1997). Die Bindung des IEP (LtrA-Protein) an das Gruppe-II-Intron (*ltrB*-Intron-RNA) führt zur Bildung eines Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes, wodurch die Erkennung von spezifischen Sequenzen in der Ziel-DNA initiiert wird. In *L. lactis* geht das IEP zu Beginn eine Wechselwirkung in der -23 bis -13 Position der 5'-Exon-Region ein wodurch eine lokale DNA-Entwindung ausgelöst wird, die es den EBS2-, EBS1- und δ -Sequenzen in der Intron-RNA ermöglicht Basenpaarungen mit den komplementären IBS2-, IBS1- und δ '-Sequenzen in der Wirts-DNA einzugehen. Die Gruppe-II-Intron RNA integriert direkt mittels „reverse splicing“ in den Einzelstrang der doppelsträngigen Wirts-DNA, während das IEP aufgrund seiner DNA Endonuklease-Aktivität den komplementären Strang in der 3'-Exon-Region spaltet und das 3' Ende als Primer für die Reverse Transkription der inserierten Intron RNA nutzt (Frazier *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2003). Im Anschluss erfolgt die Integration der Intron cDNA durch wirtseigene DNA Rekombinations- oder Reparaturenzyme (Cousineau *et al.*, 1998).

Die Erzeugung von ClosTron-Insertionsmutanten erfolgte in dieser Arbeit mit dem für Clostridien modifizierten Vektor pMTL007C-E2, der zweiten Generation des pMTL007 (Heap *et al.*, 2010). Um eine Integration des Gruppe-II-Introns in das gewünschte Gen zu ermöglichen, wurde dessen Erkennungssequenz durch eine SOE-PCR (2.7.8.6) an das Zielgen angepasst und die modifizierte 350-bp-Intron-DNA über die Schnittstellen *HindIII* und *BsrGI*

an das 5'-Ende des Gruppe-II-Introns ligiert. Da der für das IEP kodierende offene Leserahmen keine strukturelle Funktion besitzt, konnte dieser entfernt und durch einen selektiven Marker, eine Erythromycin-Resistenz, ausgetauscht werden. Dieser selektive Marker, der in umgekehrter Richtung im Gruppe-II-Intron integriert ist, besitzt einen *thlA*-Promotor aus *C. acetobutylicum* und ist durch ein *td* Gruppe-I-Intron aus dem Bakteriophagen T4 unterbrochen. Während des Insertionsprozesses entsteht ein RNA Intermediat, was zur Folge hat dass das Gruppe-I-Intron in der richtigen Orientierung vorliegt und sich selbst herauspleißen kann. Eine Erythromycin-Resistenz wird somit nur bei der Insertion des Gruppe-II-Introns in das Chromosom beziehungsweise das Megaplasmid pSO11 vermittelt (Heap *et al.*, 2007), weshalb man von einem „retrotranspositionactivated selectable marker“ (RAM) spricht (Karberg *et al.*, 2001). Zur Gewährleistung der Mobilität des Gruppe-II-Introns wurde die Genregion für das LtrA-Protein an einer anderen Stelle innerhalb des Mutagenese-Vektors integriert. Zur Selektion pMTL007C-E2-tragender Stämme von *C. acetobutylicum* und *E. coli* wird die über das *catP*-Gen aus *C. perfringens* vermittelte Chloramphenicol-Resistenz genutzt. Für die Replikation in Gram-negativen Organismen besitzt das Plasmid ein ColE1-Replikon, als „origin of replication“ (ORI) für Gram-positive Organismen *repH* aus pIM13. Die Synthese des Gruppe-II-Introns unterliegt bei diesem System einer Kontrolle durch einen konstitutiv exprimierten *fdx*-Promotor aus *C. sporogenes*.

3.2 Analyse des Acetat- und Aceton-Stoffwechsels

Die Reduzierung oder das Ausschalten ungewollter Nebenprodukte gilt bei der Stammoptimierung als klassisches biotechnologisches Prinzip, um die Ausbeute des gewünschten Endproduktes zu erhöhen. Vor diesem Hintergrund erfolgte die Herstellung von *C. acetobutylicum*-Mutanten mit einem Defekt im Acetat- und/oder Aceton-Stoffwechsel (Lehmann *et al.*, 2012a). Bei den auf dem ClosTron-System basierenden Insertionsmutanten handelt es sich um Stämme mit einer inaktivierten Phosphotransacetylase (Pta), einer Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) sowie einer Doppel-Integrante beider genannten Enzyme (Adc/Pta) (Abbildung 3.7).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Transkriptom (DNA Microarrays) (2.10) dieser Integrationsmutanten mit dem von *C. acetobutylicum* ATCC 824 als Referenz verglichen werden. Dabei stellte die kontinuierliche Kultivierung den Ausgangspunkt dar, um eine reproduzierbare Qualität der Proben zu gewährleisten. Es wurde zudem erhofft, dass durch diese Form der Fermentationstechnik ein noch tieferes Verständnis für den komplexen Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* gewährt wird, da sie die mit Batch-Kultivierungen

einhergehenden Begleiterscheinungen, wie beispielsweise den sogenannten „Acid Crash“ (Maddox *et al.*, 2000), verhindert.

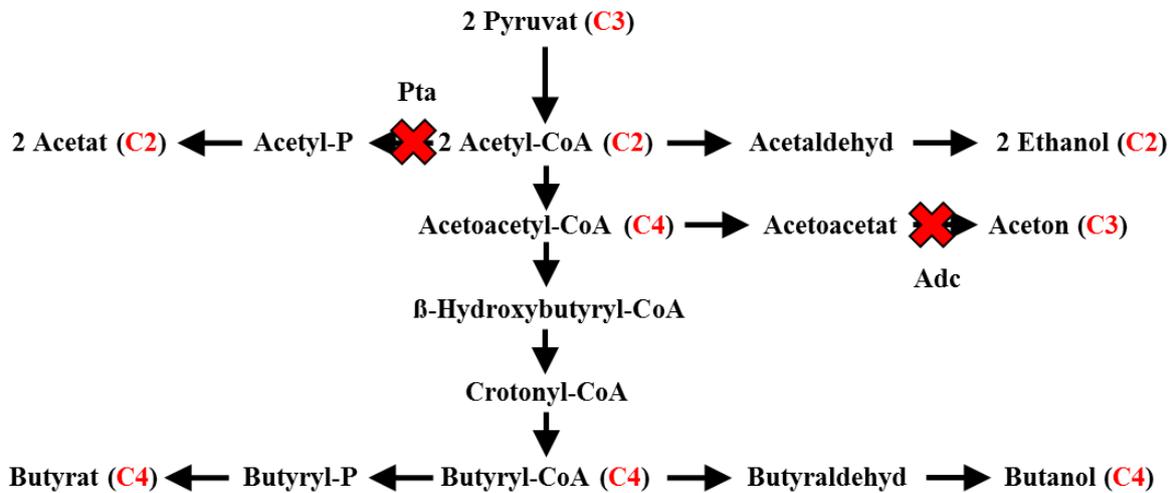


Abbildung 3.7: Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* ATCC 824. In rot dargestellt sind die den Fermentationsprodukten entsprechenden C-Körper. Die Phosphotransacetylase (Pta) ist in *C. acetobutylicum* *pta::int(80)* und die Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) in *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* inaktiviert (rotes Kreuz). Zur Herstellung der Doppel-Integrierte *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* Δ RAM-*pta::int(80)* wurde die RAM-Kassette aus dem *adc*-Gen entfernt.

3.2.1 Kontinuierliche Kultivierung der *C. acetobutylicum*-Stämme

C. acetobutylicum ATCC 824 und die von der Universität Rostock für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Mutanten-Stämme, *pta::int(80)*, *adc::int(180)* sowie *adc::int(180)* Δ RAM-*pta::int(80)* (2.2), wurden zur physiologischen Charakterisierung in einem pH-kontrollierten Chemostaten (2.5.4.2) unter Phosphatlimitierung (2.3.2) kultiviert. Nach dem Beimpfen des Fermenters mit 100 ml einer logarithmisch wachsenden MMVK-Vorkultur (2.5.4.1) folgte eine Anwachsphase von ca. 12-16 h, in der die Kultur mit 50 U/min gerührt, mit Stickstoff durchgast und konstant auf 37 °C sowie einem pH von 5,7 gehalten wurde. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 2-3 wurde die Substratpumpe für die automatische Zufuhr des Vorratsmediums (t = 0 h) zugeschaltet. Nach einer Etablierungsphase der Zellen, wurde die Kultur nur durch den externen Parameter pH kontrolliert. Eine Zellernte für die DNA Microarray Analysen (2.10) erfolgte unter stabilen *steady state* Bedingungen (pH 5,7; Acidogenese bzw. pH 4,5; Solventogenese), Proben zur Bestimmung des Produktspektrums (2.6.3) wurden alle 12 h entnommen. Die zellfreien Kulturüberstände dienten darüber hinaus der enzymatischen Konzentrationsbestimmung von Glukose (2.6.4) und Laktat (2.6.5).

3.2.1.1 Charakterisierung von *C. acetobutylicum pta::int(80)*

Die Abbildung 3.8 zeigt den Wechsel zwischen der Säure- (pH 5,7) und der Lösungsmittelphase (pH 4,5). Dargestellt sind die Fermentationsprofile vom Referenzstamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum pta::int(80)* (b). Nach etwa 4 Tagen ($t = 84 - 96$ h) kennzeichneten eine konstante Zelldichte ($OD_{600} = \sim 4,07$) sowie stabile Produktkonzentrationen den Beginn des acidogenen *steady state* Wachstums bei pH 5,7. Für die *pta*-Integrierte waren ~ 5 mM Acetat im zellfreien Kulturüberstand nachweisbar, eine gegenüber dem Wildtyp (~ 31 mM) um ~ 84 % reduzierte Konzentration. Gleichzeitig wurde mit ~ 95 mM eine, verglichen mit *C. acetobutylicum* ATCC 824 (~ 57 mM), um ~ 40 % gesteigerte Butyratmenge bestimmt. Laktat konnte nicht detektiert werden (Anhang, Abbildung A33). Im Anschluss an die erste Probennahme ($t = 120$ h) für die DNA Microarray Analysen (2.10) (*steady state* pH 5,7; Acidogenese), wurde durch das vorübergehende Abschalten der pH-Kontrolle der „shift“ des pH-Wertes von 5,7 auf 4,5 und somit die Lösungsmittelproduktion eingeleitet. Die *pta*-Mutante benötigte ~ 21 h, um den pH 4,5 zu erreichen und somit in etwa 12,5 h länger als der Wildtyp ($\sim 8,5$ h). Solventogenes *steady state* Wachstum (pH 4,5) wurde ca. 24 h nach wieder Einschalten der automatischen pH-Kontrolle erreicht. Die Glukosekonzentration im zellfreien Kulturüberstand von *C. acetobutylicum pta::int(80)* stieg auf ~ 94 mM, eine im Vergleich zum Wildtyp (~ 69 mM) deutlich höherer Titer. Die Zelldichte blieb stabil bei $OD_{600} = \sim 3,72$ und wies somit gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 ($OD_{600} = \sim 4,06$) einen niedrigeren Wert auf. Die Analyse der Fermentationsprodukte ergab, dass mit ~ 38 mM Butanol und ~ 18 mM Aceton verglichen mit dem Wildtyp vergleichbare Konzentrationen produziert wurden (~ 45 mM Butanol, ~ 20 mM Aceton), während Ethanol in geringeren Mengen (~ 3 mM) vorlag. Wenngleich die *pta*-Mutante eine niedrigere Glukoseaufnahme aufwies, war die Gesamtausbeute an Lösungsmitteln bezogen auf den Glukoseverbrauch ($0,173 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$) ähnlich dem des Wildtyps ($0,176 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$) (Anhang, Tabelle A16). Weiterhin zeigte die *pta*-Mutante während des *steady state* Wachstums bei pH 4,5 eine konstante Butyratkonzentration von ~ 19 mM, ein Titer der *C. acetobutylicum* ATCC 824 nahe kommt (~ 24 mM). Folglich offenbarte *C. acetobutylicum pta::int(80)* eine deutliche Reassimilation dieser Säure im Zuge der solventogenen Wachstumsphase. Laktat konnte nicht im zellfreien Mediumüberstand der *pta*-Integrierte gemessen werden (Anhang, Abbildung A33). Für die vergleichenden Transkriptomanalysen erfolgte eine zweite Probennahme von Zellen nach 240 h (*steady state* pH 4,5; Solventogenese).

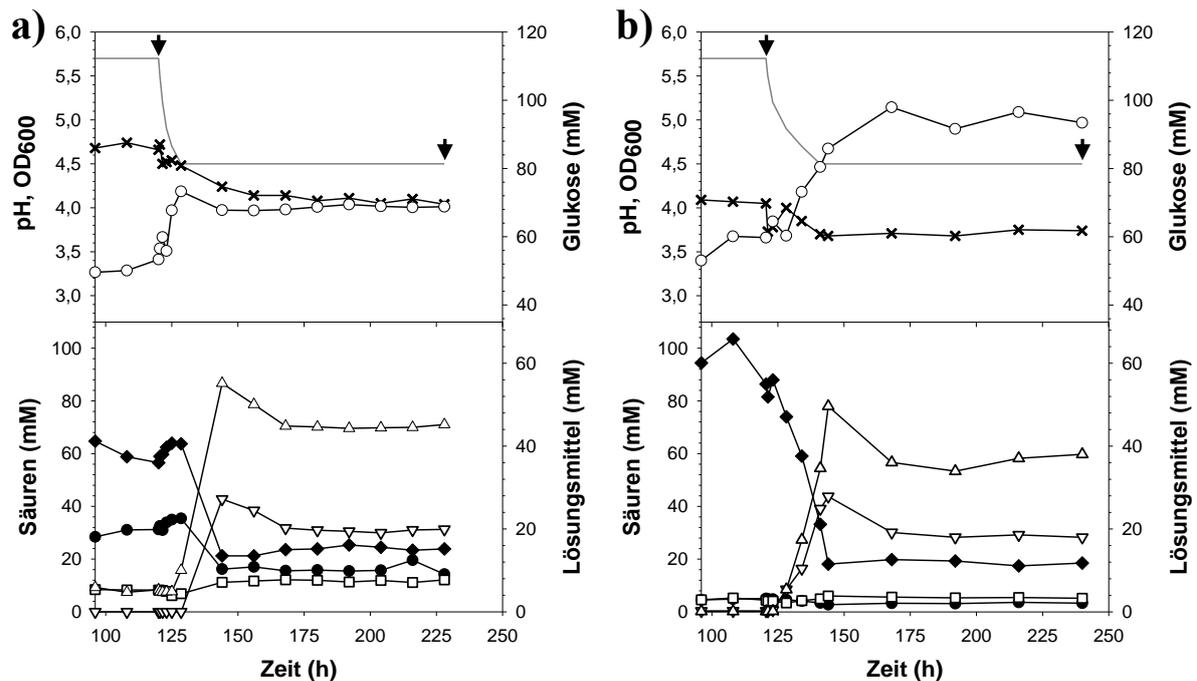


Abbildung 3.8: Fermentationsprofile von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum pta::int(80)* (b). Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten bis zum Erreichen eines *steady state* Wachstums bei pH 5,7 und pH 4,5 kultiviert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen, um Wachstum (x), pH (–) und Glukosekonzentration (o) verfolgen zu können. Die Fermentationsprodukte Acetat (●), Butyrat (◆), Aceton (▽), Ethanol (□) und Butanol (Δ) wurden mittels Gaschromatographie bestimmt wobei interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden (2.6.3). Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA Microarray Analysen. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

3.2.1.2 Charakterisierung von *C. acetobutylicum adc::int(180)*

Acidogenes *steady state* Wachstum bei pH 5,7 wurde nach 4 Tagen ($t = 96$ h) erreicht. Dabei wies die Kultur von *C. acetobutylicum adc::int(180)* eine stabile Optische Dichte von $\sim 4,52$ sowie konstante Konzentrationen an Glukose (~ 44 mM), Acetat (~ 30 mM) und Butyrat (~ 50 mM) auf. Somit waren bei pH 5,7 die produzierten Mengen an Acetat und Butyrat vergleichbar mit denen von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (~ 31 mM bzw. ~ 57 mM). Nach einer Zellernte ($t = 120$ h) für die Transkriptomanalysen mittels DNA Microarray (2.10) (*steady state* pH 5,7; Acidogenese) wurde die Übergangsphase zur Lösungsmittelproduktion durch Abschalten der pH-Kontrolle eingeleitet. Durch natürliche Ansäuerung des Mediums sank der externe pH innerhalb von 9 h von pH 5,7 auf pH 4,5. Unter gleichen Bedingungen benötigte der Wildtyp $\sim 8,5$ h. Während des „pH-shifts“ stieg in der *adc*-Integrante die Glukosekonzentration auf einen Wert von 64,54 mM und die optische Dichte fiel (OD_{600}) auf 4,11 ab. Ein erneutes *steady state* Wachstum der Kultur bei pH 4,5 wurde innerhalb von 48 h erreicht. Dieser Zustand zeichnete sich durch eine stabile Biomasse ($OD_{600} = \sim 4,25$) und ~ 66 mM Glukose, eine gegenüber dem Wildtyp (~ 69 mM) vergleichbare Konzentration, aus. Nur

geringfügige Mengen an Aceton (~2 mM), eine signifikant reduzierte Konzentration an Butanol (~24 mM) sowie eine vergleichbare Ethanolkonzentration (~6 mM) konnten im gegenüber dem Wildtyp (~20 mM Aceton, ~45 mM Butanol, ~8 mM Ethanol) im zellfreien Kulturüberstand der *adc*-Mutante detektiert werden. Die Alkoholproduktion wurde, übereinstimmend mit den vorherigen in Batch-Kultur durchgeführten Studien (Lehmann *et al.*, 2012a), deutlich reduziert, obwohl sich das ABE-Verhältnis zu Gunsten von Butanol verbesserte. Das finale Verhältnis von Alkohol:Aceton (BE/A) betrug 20 für die *adc*-Mutante verglichen mit 3 beim Wildtyp (Anhang, Tabelle A16). Für *C. acetobutylicum adc::int(180)* konnte weiterhin eine eindeutige Abnahme der Butyratmenge von ~50 mM auf ~5 mM nachgewiesen werden, während Acetat in einer Konzentration von bis zu ~35 mM vorlag und folglich nicht reassimiliert wurde. Laktat konnte zu keinem Zeitpunkt der Kulturführung im Mediumüberstand der *adc*-Integrierte nachgewiesen werden (Anhang, Abbildung A33).

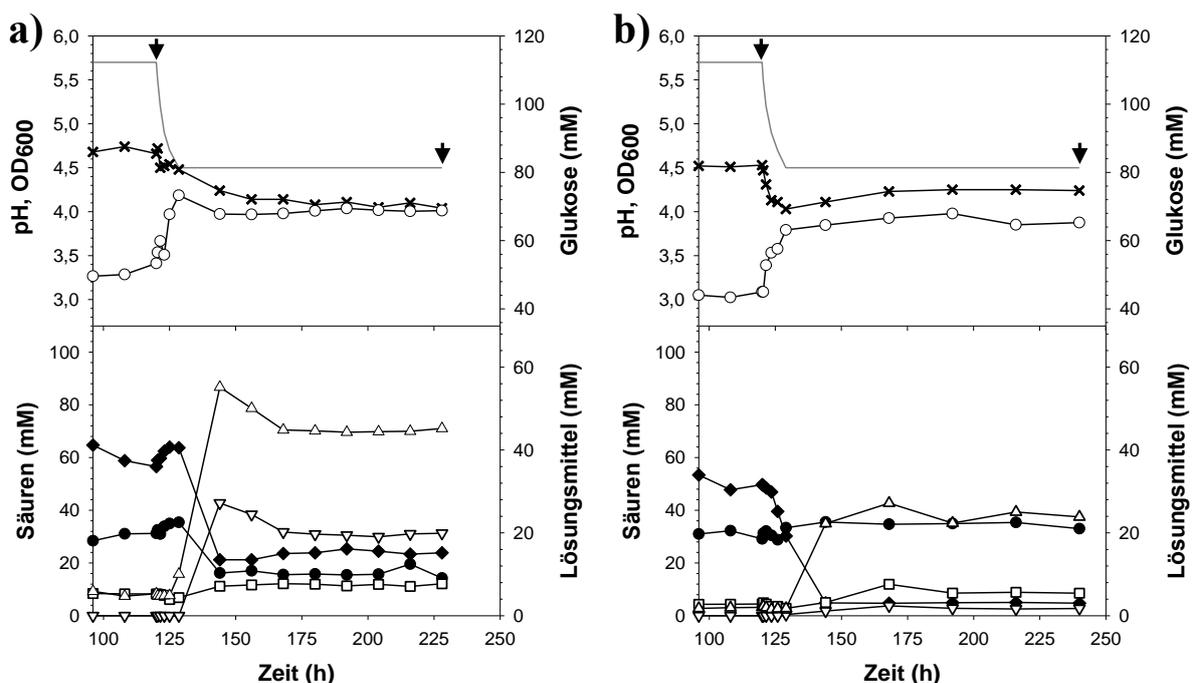


Abbildung 3.9: Fermentationsprofile von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum adc::int(180)* (b). Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten bis zum Erreichen eines *steady state* Wachstums bei pH 5,7 und pH 4,5 kultiviert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen, um Wachstum (x), pH (—) und Glukosekonzentration (o) verfolgen zu können. Die Fermentationsprodukte Acetat (●), Butyrat (◆), Aceton (▽), Ethanol (□) und Butanol (Δ) wurden mittels Gaschromatographie bestimmt wobei interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden (2.6.3). Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA Microarray Analysen. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

3.2.1.3 Charakterisierung von *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*ΔRAM-*pta::int(80)*

Die Zellen der *adc/pta*-Doppel-Knock-Out-Mutante erreichten nach 108 h acidogenes *steady state* Wachstum bei pH 5,7. Dieses zeichnete sich durch konstante Glukose- (~52 mM), Acetat- (~6 mM) und Butyratkonzentrationen (~57 mM) sowie eine stabile $OD_{600} = \sim 4,01$ aus (Anhang, Tabelle A16). Somit wies die Doppel-Knock-Out-Mutante, wie bereits durch Lehmann *et al.* (2012) beobachtet, einen Acetat-armen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (~31 mM) auf. Die detektierte Menge an Butyrat entsprach der des Referenzstamms ATCC 824 (~57 mM). Die Probennahme für die Transkriptomanalysen erfolgte ca. 3 Volumenwechsel später ($t = 144$ h). Nach einer kurzen Regenerationszeit der Kultur wurde der pH-„shift“ von pH 5,7 auf pH 4,5 eingeleitet. Der pH-Wechsel war nach 8 h und 40 min vollzogen, wodurch die Doppel-Integrate eine zum Wildtyp (~8,5 h) vergleichbare Zeit aufwies. Solventogenes *steady state* Wachstum bei pH 4,5 wurde nach 192 h, und somit ca. 39 h nach erneuter Inbetriebnahme der automatischen pH-Kontrolle, erreicht. Wie der Abbildung 3.10 zu entnehmen ist, zeichnete sich dieser Zustand durch eine stabile Biomasse ($OD_{600} = \sim 3,73$) und ~86 mM Glukose, eine gegenüber dem Wildtyp (~69 mM) um etwa 20 % höhere Konzentration, aus. Weiterhin konnte mit ~16 mM Acetat ein im Vergleich zum acidogenen Wachstum bei pH 5,7 (~5 mM) etwa 3-mal so hoher Titer detektiert werden. Die im zellfreien Kulturüberstand der *adc/pta*-Doppel-KO-Mutante bestimmte Butyratmenge (~19 mM) ähnelte der für *C. acetobutylicum* ATCC 824 bestimmten Konzentration (~24 mM). Wie zuvor in der *adc*-Mutante (~2 mM) konnte auch bei der *adc/pta*-Integrate (~1 mM) eine nur geringfügige Menge an Aceton detektiert werden (Anhang, Tabelle A16). Butanol und Ethanol erreichten in der Doppel-Knock-Out-Mutante Konzentrationen von ~20 mM bzw. ~3 mM, Titer die verglichen mit dem Wildtyp (~45 mM; ~8 mM) deutlich geringer ausfielen. Während im Zuge der Batch-Fermentation von *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM-*adc::int(180)* ~10 mM Laktat produziert wurden (Lehmann *et al.*, 2012a), konnte im zellfreien Kulturüberstand der *adc/pta*-Mutante keine entsprechende Anreicherung nachgewiesen werden (Anhang, Abbildung A33).

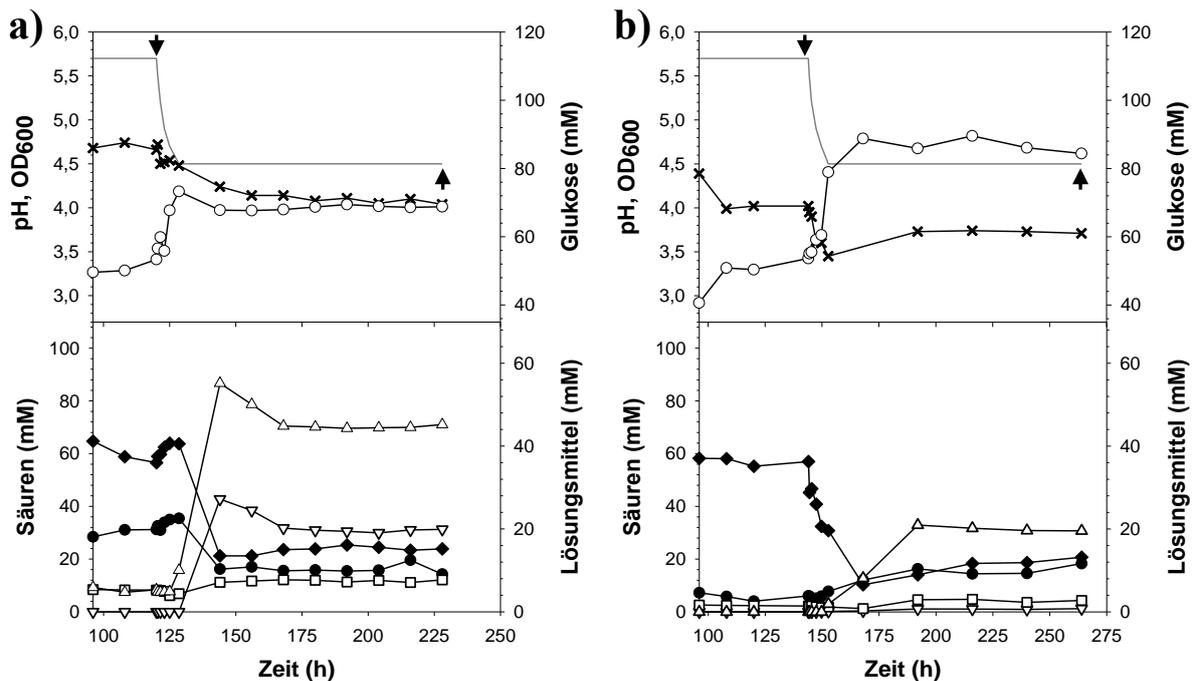


Abbildung 3.10: Fermentationsprofile von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum* *adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)* (b). Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten bis zum Erreichen eines *steady state* Wachstums bei pH 5,7 und pH 4,5 kultiviert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen, um Wachstum (x), pH (–) und Glukosekonzentration (o) verfolgen zu können. Die Fermentationsprodukte Acetat (●), Butyrat (◆), Aceton (▽), Ethanol (□) und Butanol (Δ) wurden mittels Gaschromatographie bestimmt wobei interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden (2.6.3). Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA Microarray Analysen. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

3.2.2 Transkriptomanalyse

Für eine vergleichende Genexpressionsanalyse von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dessen Integrationsmutanten, *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*, *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* sowie *C. acetobutylicum* *adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)*, wurde Gesamt-RNA aus Zellproben der jeweiligen Chemostatkulturen zu *steady state* Konditionen bei pH 5,7 (Acidogenese) und pH 4,5 (Solventogenese), isoliert (2.7.2.3.2). Die gewonnene RNA wurde mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und dabei mit den fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert (2.10.1). Anschließend erfolgte die Hybridisierung der markierten cDNA-Moleküle an die immobilisierten Nukleinsäuresequenzen (*probes*) auf der Oberfläche des DNA Microarrays (2.10.2). Die für den acidogenen (pH 5,7) und solventogenen (pH 4,5) Gärungsstoffwechsel der ClosTron Knock-Out-Stämme repräsentativen Expressionsdaten basieren auf je einem biologischen Experiment und vier Hybridisierungsreaktionen (jeweils 2 Microarray Experimente mit gegenläufiger Cy3-/Cy5-Farbstoffmarkierung). Um das Expressionsverhältnis eines Gens als signifikant hochreguliert

($\geq 3,0$) oder reprimiert ($\leq -3,0$) definieren zu können, wurde der Faktor 3 als ein Schwellenwert für Transkriptionsänderungen unter den jeweiligen Bedingungen verwendet (2.10.4). Die Interpretation der Microarray Daten wurde unterteilt in die Untersuchung von Genen, die für Enzyme des primären Stoffwechsels kodieren (3.2.2.1) sowie einer Auswahl weiterer signifikant auf Transkriptionsebene beeinflusster Gene (3.2.2). Bei der Array Express-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) kann unter Verwendung der Zugangsnummer E-MTAB-2058 der vollständige Datensatz aller DNA Microarrays eingesehen werden.

3.2.2.1 Analyse der Gene des Zentralstoffwechsels

In Anbetracht der Alkohol produzierenden Stoffwechselwege von *C. acetobutylicum*, konnte für das auf dem pSOL1 lokalisierte Gen *adhE2* (CAP0035) in allen 3 Mutanten-Stämmen ein, gegenüber dem Wildtyp, signifikant verändertes Expressionsverhalten aufgezeigt werden (Tabelle 3.9). Der für die NADH-abhängige Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2 kodierende ORF CAP0035 (Nölling *et al.*, 2001) wies sowohl in der *pta*-Mutante (~44-fach bei pH 5,7; ~583-fach bei pH 4,5) als auch in der *adc/pta*-Integrierte (~38-fach bei pH 5,7; ~283-fach bei pH 4,5) ein signifikant erhöhtes Transkriptlevel auf. *C. acetobutylicum adc::int(180)* zeigte hingegen während des solventogenen Wachstums bei pH 4,5 ein verringertes Expressionsverhältnis des *adhE2*-Gens (-4,19-fach), während für die Genprodukte des *sol*-Operons (CAP0162-164) eine erhöhte mRNA-Menge detektiert werden konnte. Während des acidogenen Wachstums der *adc*-Mutante, waren keine eindeutigen Veränderungen im Expressionsmuster der Gene *adhE2* (CAP0035), *adhE1* (CAP0162) oder den Untereinheiten der CoA-Transferase (CoAT) (CAP0163-164) zu beobachten.

Das für eine L-Laktat-Dehydrogenase kodierende Gen CAC0267 zeigte sowohl in der *pta*-Mutante (~7,4-fach bei pH 5,7; ~6,4-fach bei pH 4,5) als auch der *adc/pta*-Doppel-Integrierte (~3,1-fach bei pH 5,7; ~7,2-fach bei pH 4,5) ein signifikant erhöhtes Expressionsverhältnis, während für die *adc*-Mutante leicht verringerte Werte detektiert werden konnten. Eine Laktatbildung konnte, trotz des gesteigerten Transkriptlevel, in keinem der Stämme während der Kultivierungen nachgewiesen werden.

Weiterhin zeigten in der *adc/pta*-Doppel-Knock-Out-Mutante die im sogenannten *BCS*-Operon (Butyryl-CoA synthesis; (Cornillot *et al.*, 1997a)) organisierten Gene, *hbd* (CAC2708), *crt* (CAC2712), *bcd* (CAC2711), *etfA* (CAC2709) und *etfB* (CAC2710), sowie das primäre Thiolase-Gen *thlA* (CAC2873) ein deutlich verändertes Transkriptionsprofil während des solventogenen Wachstums (Tabelle 3.9). Die signifikante Induktion dieser Gene unterstützt die Hypothese einer erhöhten intrazellulären Verfügbarkeit von Butyryl-CoA,

wodurch C₄-Körper, Butyrat bei pH 5,7 und Butanol bei pH 4,5, die Hauptfermentationsprodukte darstellen (Abbildung 3.10, b)). Für *C. acetobutylicum pta::int(80)* konnte bei pH 4,5 ein signifikant gesteigertes Transkriptlevel der Thiolase (*thlA*) und der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*hbd*) bestimmt werden (~3,8-fach bzw. 3-fach). Die *adc*-Mutante wies weder bei pH 5,7 noch bei pH 4,5 eine signifikante Veränderung im Expressionsmuster dieser Gene auf.

Wenig überraschend war die signifikant reprimierte Transkription der Acetatkinase (*ack*, CAC1743) in *C. acetobutylicum*-Mutanten mit unterbrochenem *pta*-Gen (CAC1742). Das Enzym wird vom bicistronischen *pta-ack*-Operon (CAC1742-1743) kodiert und katalysiert den letzten Schritt in der Acetatsynthese. Die *adc*-Mutante wies trotz erhöhter Acetatkonzentrationen unter solventogenen *steady state* Bedingungen bei pH 4,5 keine signifikant veränderte Expression des *ack*- und *pta*-Gens auf. Ebenso zeigte die Expression der Gene *ptb* („Phosphotransbutyrylase“, CAC3076) und *buk* („Butyrate kinase“, CAC3075) keine signifikante Induktion in der *pta*-Mutante, obwohl im zellfreien Kulturüberstand hohe Konzentrationen an Butyrat bestimmt werden konnten. Erhöhte mRNA-Mengen beider Gene konnten für die *adc/pta*-Doppel-Integrierte bei pH 4,5 detektiert werden (~2,8-fach, CAC3075 bzw. 3-fach, CAC3076).

Tabelle 3.9: Expressionsprofile der zentralen Stoffwechselfgene von *C. acetobutylicum pta::int(80)* (*pta*), *C. acetobutylicum adc::int(180)* (*adc*) und *C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)* (*adc/pta*). RNA Proben wurden von acidogenen bzw. solventogenen *steady state*-Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). War das Expressionsverhältnis eines Gens $\geq 3,0$, dann wurde dieses im Vergleich zum Wildtyp signifikant induziert. Bei einem Wert von $\leq -3,0$ lag eine signifikante Repression vor. Durch „n.d.“ (nicht definiert) wurden Gene gekennzeichnet, die kein Transkript aufwiesen oder die angewandten Filterkriterien nicht erfüllten.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	<i>pta</i>		<i>adc</i>		<i>adc/pta</i>	
			pH 5,7	pH 4,5	pH 5,7	pH 4,5	pH 5,7	pH 4,5
			(t = 120 h)	(t = 240 h)	(t = 120 h)	(t = 240 h)	(t = 144 h)	(t = 264 h)
CAP0025	<i>pdh</i>	Pyruvate decarboxylase	1,09	-1,12	1,81	1,24	1,02	1,52
CAP0035	<i>adhE2</i>	Aldehyde/alcohol dehydrogenase (NADH)	44,11	582,62	-1,18	-4,19	37,56	283,05
CAP0078	<i>thlB</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	1,33	1,25	1,35	1,90	1,16	2,35
CAP0162	<i>adhE1</i>	Aldehyde/alcohol dehydrogenase (NADH)	3,09	1,05	1,43	3,50	-1,40	3,38
CAP0163	<i>ctfA</i>	Butyrate-acetoacetate CoA transferase subunit A	3,41	1,06	1,79	3,28	-1,50	3,51
CAP0164	<i>ctfB</i>	Butyrate-acetoacetate CoA transferase subunit B	2,42	1,92	1,80	4,08	1,08	2,51
CAP0165	<i>adc</i>	Acetoacetate decarboxylase	2,83	-1,16	-	-	-	-

CAC0267	<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	7,44	6,40	-1,63	-1,44	3,08	7,20
CAC1742	<i>pta</i>	Phosphotransacetylase	-	-	-1,27	-1,00	-	-
CAC1743	<i>ack</i>	Acetate kinase	-16,26	-14,52	-1,29	1,21	-1,81	-1,40
CAC2229	<i>pfor</i>	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase	-1,67	1,07	-1,18	1,16	1,17	2,82
CAC2708	<i>hbd</i>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	1,48	3,04	-1,17	-1,63	2,70	4,37
CAC2709	<i>etfA</i>	Electron transfer flavoprotein subunit A	1,63	2,74	-1,11	-1,22	2,03	7,61
CAC2710	<i>etfB</i>	Electron transfer flavoprotein subunit B	1,80	2,10	-1,24	-1,42	1,40	4,63
CAC2711	<i>bcd</i>	Butyryl-CoA dehydrogenase	1,62	1,80	-1,05	-1,44	1,70	5,49
CAC2712	<i>crt</i>	Enoyl-CoA hydratase	1,42	2,24	-1,09	-1,84	2,00	3,88
CAC2873	<i>thlA</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	1,53	3,78	-1,73	-1,79	1,71	4,72
CAC3075	<i>buk</i>	Butyrate kinase	1,11	1,40	-1,01	-1,56	1,15	2,80
CAC3076	<i>ptb</i>	Phosphate butyryltransferase	1,57	1,37	1,17	-1,61	1,14	3,01
CAC3298	<i>bdhA</i>	Butanol dehydrogenase A	-1,06	-1,32	-1,33	1,06	-1,33	-1,50
CAC3299	<i>bdhB</i>	Butanol dehydrogenase B	1,19	-1,11	1,09	1,27	-1,02	-1,04

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

3.2.2.2 Analyse des übrigen Transkriptom

Die Auswertung globaler transkriptioneller Veränderungen in den 3 Mutanten-Stämmen ist in Abbildung A34 (siehe Anhang) anhand von Venn-Diagrammen zusammengefasst. Dabei wurde die Anzahl aller Gene, die sowohl während der Acidogenese als auch Solventogenese eine signifikant erhöhte oder verringerte Transkriptmenge aufwiesen, vergleichend dargestellt.

Am auffälligsten war das Expressionsprofil von Genen, die im Zusammenhang mit dem Sulfattransport und der -reduktion stehen. Für die *pta*-Mutante konnte während dem acidogenen Wachstum bei pH 5,7 (Tabelle 3.10) eine signifikant verringerte Transkription von Genen zur Aufnahme von Sulfat (CAC0106-0108) (~-7,1-fach), der Umwandlung intrazellulären Sulfats zu Cystein (CAC0103, CAC0104, CAC0109, CAC0110) und der Biosynthese von Methionin (CAC0102) (~-6-fach) nachgewiesen werden (Abbildung 3.12). Ein deutlich reprimiertes Expressionsverhältnis zeigte auch CAC0105 (~-8,1-fach), ein ORF der ebenfalls innerhalb dieses großen Gen-Clusters (CAC0102-110) (Abbildung 3.11) lokalisiert ist und für eines der insgesamt fünf putative Ferredoxine kodiert (Nölling *et al.*, 2001). Unter solventogenen *steady state* Bedingungen bei pH 4,5, war gegenüber dem Wildtyp eine signifikante Induktion der Gene CAC0102-110 (~8,1-fach) detektierbar. Die Transkriptionsanalyse der *adc*-Mutante offenbarte erhöhte Transkriptlevel für Gene, die für eine Umsetzung von Sulfid zu Cystein (CAC0931, CAC2235), Cystein zu Homocystein

(CAC0390-91), Homoserin zu Cystathion (CAC1825, CAC0930) und O-Acetylhomoserin zu Homocystein (CAC0102, CAC2783) verantwortlich sind (Tabelle 3.10).

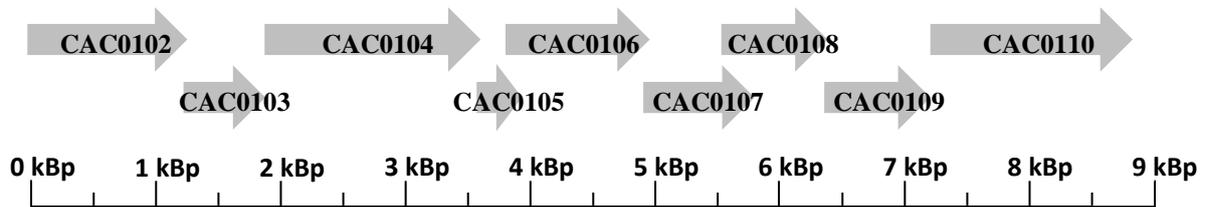


Abbildung 3.11: Chromosomale Anordnung der Gene CAC0102-0110 in *C. acetobutylicum*. Erläuterung siehe Text. CAC0102: O-acetylhomoserine sulfhydrylase; CAC0103: *cysC*, Adenylylsulfate kinase; CAC0104: Adenylylsulfate reductase; CAC0105: *fer*, Ferredoxin; CAC0106: ABC-type probable sulfate transporter, periplasmic binding protein; CAC0107: ABC-type sulfate transporter, ATPase component; CAC0108: ABC-type probable sulfate transporter, permease protein; CAC0109: *cysD*, sulfate adenylyltransferase subunit 2; CAC0110: *cysN*, GTPase, sulfate adenylyltransferase subunit 1.

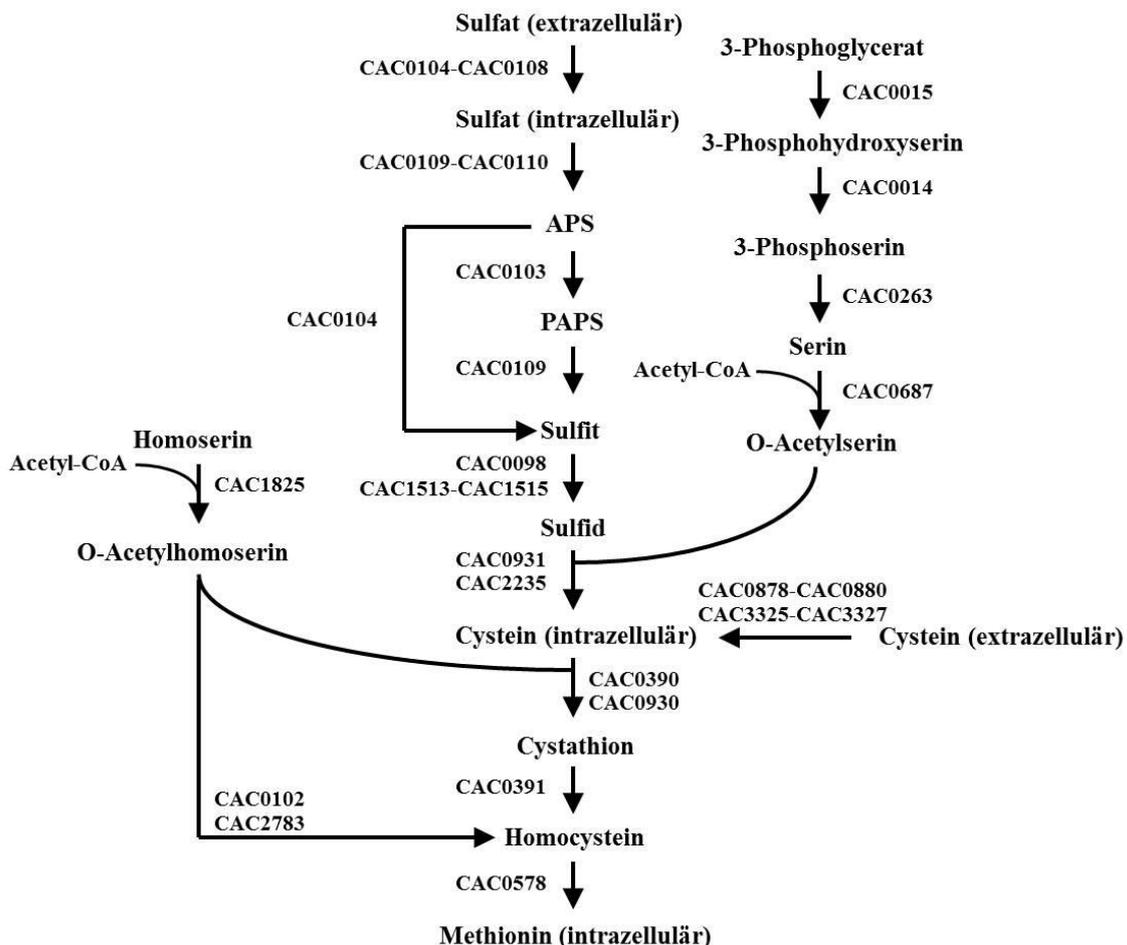


Abbildung 3.12: Schwefelmetabolismus in *C. acetobutylicum* ((Alsaker *et al.*, 2010; Andre *et al.*, 2008), mod.)

Interessanterweise, war für die an der Synthese von organischen Schwefelmetaboliten beteiligten Gene in der *adc/pta*-Doppel-Integrierte keine signifikanten Veränderungen auf der

Transkriptebene nachweisbar, weder während dem acidogenen noch dem solventogenen *steady state* Wachstum.

Weiterhin konnte eine signifikant gesteigerte Expression des putativen *ilv-leu* Operon (CAC3169-3174) (~3,4-fach) in *C. acetobutylicum pta::int(80)* während des acidogenen Wachstums bei pH 5.7 detektiert werden. Die Gene, dessen Produkte in den Stoffwechsel der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin involviert sind, wurden bereits in einer früheren Studie als Reaktion auf Butyratstress induziert (Alsaker *et al.*, 2010).

Während dem acidogenen sowie solventogenen *steady state* Wachstum konnte für alle 3 Mutanten-Stämme eine signifikant erhöhte Transkriptmenge von Genen identifiziert werden, die für Phosphotransferase-Systeme (PTS) kodieren (Tabelle 3.10). Eines dieser PT-Systeme ist auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisiert (CAP0066-68) und zeigt große Sequenzhomologien zu einem Mannose/Fruktose-PTS, das zweite, ein Laktose-PTS, wird von 2 Transkriptionseinheiten (CAC2963-64; CAC2965-66) des Chromosoms kodiert (Servinsky *et al.*, 2010).

Die zwei Gene CAP0036 und CAP0037, annotiert als „Uncharacterized gene products with unknown function“ (Nölling *et al.*, 2001), bilden eine bicistronische Transkriptionseinheit mit einer Länge von ~1,4 kb und zeigten in kontinuierlichen Kulturen von *C. acetobutylicum* eine deutlich induzierte Expression während des acidogenen Wachstums, wohingegen sie unter solventogenen *steady state* Bedingungen signifikant reprimiert vorlagen (Grimmler *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2010). Für die Mutanten-Stämme *pta::int(80)* sowie *adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)*, war im Zuge des solventogenen Wachstums bei pH 4,5 ein stark erhöhtes Transkriptlevel beider Gene gegenüber dem Wildtyp nachweisbar. In *C. acetobutylicum adc::int(180)* konnte hingegen kein signifikanter Einfluss auf die Expression des bicistronischen Operons CAP0036-37 detektiert werden.

Weiterhin wiesen alle 3 Knock-Out Mutanten ein im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 signifikant reprimiertes Expressionsverhältnis von Genen auf, die für Flagelline und Proteine der Chemotaxis kodieren (Tabelle 3.10). Dazu gehören unter anderem die als „chemotaxis proteins“ annotierten Gene CAC0304 (*motA*) und CAC0305 (*motB*), das putative Operon CAC1600-01, CAC1634, das Flagellin FlaC (bzw. „Hook-associated flagellin protein Hag“, CAC2203), CAC2204 oder die in einem gemeinsamen Operon lokalisierten Gene CAC2205-14.

Tabelle 3.10: Ausgewählte Gene der *C. acetobutylicum*-Mutanten *pta::int(80)* (*pta*), *adc::int(180)* (*adc*) und *adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)* (*adc/pta*) mit einem, im Vergleich zum Wildtyp ATCC 824, signifikant erhöhten ($\geq 3,0$) oder reprimierten ($\leq -3,0$) Transkriptlevel. RNA Proben wurden von acidogenen bzw. solventogenen *steady state*-Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Durch „n.d.“ (nicht definiert) wurden Gene gekennzeichnet, die kein Transkript aufwiesen oder die angewandten Filterkriterien nicht erfüllten.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	<i>pta</i>		<i>adc</i>		<i>adc/pta</i>	
			pH 5,7	pH 4,5	pH 5,7	pH 4,5	pH 5,7	pH 4,5
			(t = 120 h)	(t = 240 h)	(t = 120 h)	(t = 240 h)	(t = 144 h)	(t = 264 h)
CAP0036		Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i>	1,21	78,77	1,66	-1,56	1,03	15,40
CAP0037		Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i>	1,08	113,05	1,33	-1,64	1,21	18,49
CAP0066		ptna Mannose-specific phosphotransferase system component IIAB	n.d.	n.d.	385,57	n.d.	1599,60	n.d.
CAP0067		manY/levF Mannose/fructose-specific phosphotransferase system component IIC	382,67	600,72	502,11	128,93	1038,56	n.d.
CAP0068		ptnd Mannose-specific phosphotransferase system component IID	173,94	582,21	360,98	n.d.	n.d.	n.d.
CAP0168	<i>amyA</i>	Alpha-amylase	5,19	3,07	1,40	-1,14	2,39	1,81
CAC0102		O-acetylhomoserine sulfhydrylase	-6,02	5,46	4,43	103,59	-2,59	1,30
CAC0103	<i>cysC</i>	Adenylylsulfate kinase	-8,15	10,84	4,73	157,42	-2,65	n.d.
CAC0104		Adenylylsulfate reductase	-9,88	n.d.	4,65	146,36	-2,38	n.d.
CAC0105	<i>fer</i>	Ferredoxin	-8,14	6,78	3,77	98,17	-2,13	1,68
CAC0106		ABC-type probable sulfate transporter, periplasmic binding protein	-5,57	3,11	3,47	27,64	-1,97	1,90
CAC0107		ABC-type sulfate transporter, ATPase component	-7,71	12,16	2,48	110,44	-1,52	1,52
CAC0108		ABC-type probable sulfate transporter, permease protein	-7,90	6,65	2,96	60,58	-1,60	n.d.
CAC0109	<i>cysD</i>	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	-7,84	11,61	1,89	116,37	-1,26	1,57
CAC0110	<i>cysN</i>	GTPase, sulfate adenylate transferase subunit 1	-3,89	n.d.	1,96	44,42	1,18	1,35
CAC0118	<i>cheA</i>	Chemotaxis protein CheA	-1,46	1,24	-3,24	-1,13	-3,08	-3,04
CAC0120		membrane-associated methyl-accepting chemotaxis protein	-1,45	2,13	-3,59	1,22	n.d.	n.d.

CAC0304	<i>motA</i>	chemotaxis protein MotA	-29,82	-2,76	-33,94	-4,85	-21,33	-1,63
CAC0305	<i>motB</i>	chemotaxis protein MotB	-25,60	-3,33	-24,77	-5,62	-18,18	-3,06
CAC0390		Cystathionine gamma-synthase	1,06	1,26	1,92	18,77	n.d.	n.d.
CAC0391		Cystathionine beta-lyase	1,08	1,19	1,76	13,24	n.d.	n.d.
CAC0443		methyl-accepting chemotaxis protein	-20,00	n.d.	n.d.	n.d.	-10,55	n.d.
CAC0929		SAM-dependent methyltransferase	-1,32	-1,52	3,93	9,84	1,11	1,51
CAC0930	<i>metB</i>	Cystathionine gamma-synthase	-1,54	-1,49	5,23	14,55	1,94	1,34
CAC0931		Cysteine synthase	-1,81	1,11	5,58	15,91	3,59	1,06
CAC0980	<i>pflB</i>	Pyruvate-formate-lyase	2,96	1,07	1,43	-1,12	1,44	1,20
CAC0981	<i>pflA</i>	Pyruvate-formate-lyase-activating enzyme	4,17	-1,03	1,75	-1,15	1,89	-1,22
CAC1233	<i>cheV</i>	chemotaxis protein CheV	-14,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CAC1548	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	-1,96	-1,40	-4,20	1,87	-7,78	2,21
CAC1571		Glutathione peroxidase	-4,80	-1,41	-4,04	1,17	-3,64	1,32
CAC1600		methyl-accepting chemotaxis-like protein	-8,10	-3,74	-13,98	-3,53	-11,07	-3,09
CAC1601		methyl-accepting chemotaxis-like protein	-8,23	-4,21	-11,73	-3,85	-9,89	-4,56
CAC1634		Flagellin	-107,90	n.d.	-157,50	n.d.	-59,06	-32,34
CAC1825	<i>metB</i>	homoserine O-succinyltransferase	-1,54	1,12	1,42	9,99	-1,18	1,33
CAC2167		flagellin family protein	-5,99	-2,54	-5,75	-1,53	-5,97	-1,64
CAC2203	<i>hag</i>	hook-associated protein, flagellin family	-62,47	-12,80	-58,13	-10,11	-34,91	-8,19
CAC2204		hypothetical protein	-4,28	-1,68	-5,84	-1,85	-5,70	-2,22
CAC2205	<i>fliD</i>	lagellar hook-associated protein FlID	-7,60	-2,99	-6,68	-1,82	-8,24	-2,30
CAC2206	<i>fliS</i>	flagellar protein FlIS	-7,26	-3,39	-6,95	-2,48	-8,23	-3,62
CAC2207		hypothetical protein	-6,01	-2,01	-6,55	-1,54	-7,74	-1,61
CAC2208	<i>flaG</i>	Flagellin, flagellar protein FlaG	-6,10	-2,63	-7,73	-2,20	-8,07	-2,38
CAC2209	<i>csrA</i>	carbon storage regulator, csrA	-6,69	-2,95	-8,19	-2,19	-9,16	-2,87
CAC2210	<i>fliW</i>	flagellar assembly protein FlIW	-9,05	-2,30	-10,06	-2,29	-11,63	-2,87
CAC2211	<i>flgL</i>	Flagellin, flagellar hook-associated protein 3 FlgL	-9,66	-2,81	-11,88	-2,22	-9,98	-1,97
CAC2212	<i>flgK</i>	flagellar hook-associated protein FlgK	-8,84	-2,93	-9,72	-2,63	-9,91	-3,32
CAC2213		hypothetical protein	-7,71	-3,28	-8,46	-2,41	-9,28	-3,70
CAC2214	<i>flgM</i>	flagellin synthesis regulator FlgM	-7,50	-2,47	-9,05	-2,31	-8,55	-3,15

CAC2235	<i>cysK</i>	Cysteine synthase/cystathionine beta-synthase	-2,60	1,94	2,19	14,27	-1,71	-1,93
CAC2783	<i>cysD</i>	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	-1,25	1,85	1,58	11,99	-1,49	-1,20
CAC2963	<i>lacG</i>	6-Phospho-Beta-D-Galactosidase	24,33	52,30	31,34	19,78	50,71	21,84
CAC2964	<i>lacE</i>	PTS system lactose-specific enzyme IIBC	26,28	49,57	34,97	24,24	52,58	18,47
CAC2965	<i>lacF</i>	PTS system lactose-specific enzyme IIA	37,88	96,30	47,12	n.d.	100,04	n.d.
CAC2966	<i>lacR</i>	Lactose phosphotransferase system repressor lacR	n.d.	n.d.	69,09	n.d.	n.d.	n.d.
CAC3169	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase large subunit	3,62	1,17	1,08	1,37	-1,06	-3,31
CAC3170	<i>ilvD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase	3,20	1,74	1,08	1,49	-1,13	-3,10
CAC3171	<i>leuB</i>	Isopropylmalate dehydrogenase	3,29	1,31	1,18	1,18	1,12	-4,45
CAC3172	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	3,14	1,18	1,24	1,14	1,01	-4,63
CAC3173	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase	3,74	1,02	1,37	1,12	-1,10	-5,50
CAC3174	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	3,77	1,15	1,55	1,26	1,04	-4,01
CAC3352		methyl-accepting chemotaxis protein	-2,83	-3,49	-4,49	-2,24	-4,52	-2,01
CAC3510		methyl-accepting chemotaxis protein	-2,24	-1,24	-4,11	-1,37	-3,17	1,51

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

3.3 Analyse von Integrationsmutanten des C₄-Stoffwechsels

Während des Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* wird ausgehend vom Acetyl-CoA entweder Acetat gebildet oder zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA kondensiert, welches in einer Reihe von Reaktionen zu den C₄-Produkten Butyrat und Butanol umgesetzt wird. Da dem sogenannten C₄-Weg wichtige Aufgaben bei der Energiegewinnung und der Redoxbalance zugeschrieben werden (Lehmann, 2012), wurden an der Universität Rostock im Zuge der Stammoptimierung von *C. acetobutylicum* die Gene *ptb* (CAC3076) sowie *hbd* (CAC2708) unter Verwendung des Clostron-Systems (Heap *et al.*, 2007) inaktiviert (2.2). Letzteres ist als 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd) annotiert, ein Enzym das Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert und somit einen Verzweigungspunkt zur Synthese von Butanol und Butyrat darstellt (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011). Das Gen CAC3076 kodiert für die Phosphotransbutyrylase (Ptb) die zusammen mit der Butyrat-Kinase

(Buk) den Teil des Stoffwechsels bildet, der es *C. acetobutylicum* ermöglicht Butyryl-CoA unter ATP-Bildung zu Butyrat umzuwandeln (Cary *et al.*, 1988). Die im Batch-Verfahren kultivierten Mutanten-Stämme *hbd::int(69)* und *ptb::int(87)* (Abbildung 3.13) zeigten jeweils einen noch nie zuvor beschriebenen Phänotyp und lieferten somit neue Erkenntnisse zum komplexen Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Lehmann *et al.*, 2012b). Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit bestand darin, die zur Verfügung gestellten Integrationsmutanten des C₄-Stoffwechsels mit *C. acetobutylicum* ATCC 824 als Referenz im Rahmen von vergleichenden Genexpressionsanalysen via DNA Microarrays zu analysieren. Da die kontinuierliche Kultivierung eine eindeutig definierte Trennung zwischen acidogenem und solventogenem Wachstum ermöglicht und sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit (*steady state* Bedingungen) auszeichnet, stellte diese Form der Fermentation den Ausgangspunkt für die physiologische Charakterisierung dar.

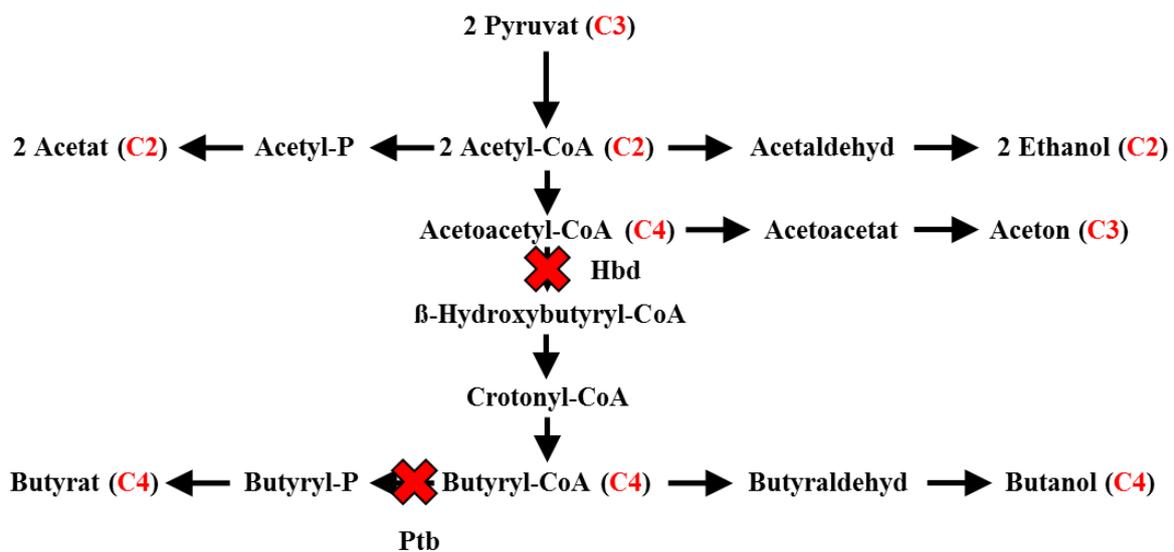


Abbildung 3.13: Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* ATCC 824. In rot dargestellt sind die den Fermentationsprodukten entsprechenden C-Körper. Die Phosphotransbutyrylase (Ptb) ist in *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* und die 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd) in *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* inaktiviert (rotes Kreuz).

3.3.1 Physiologische Charakterisierung der Clostron-Mutanten

3.3.1.1 *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*

3.3.1.1.1 Glukose Batch-Fermentation

C. acetobutylicum *ptb::int(87)* zeigte einen zuvor noch nicht beschriebenen Butyrat-negativen Phänotyp, der vor der physiologischen Charakterisierung in kontinuierlicher Kultur zunächst über Glukose Batch-Fermentationen in MS-MES Medium (2.3.2) ohne pH-Kontrolle

verifiziert werden sollte. Dabei wurde, analog zu den Studien von Lehmann *et al.* (2012b), auf eine Zugabe von Acetat zum Medium verzichtet. Die Abbildung 3.14 ist repräsentativ für eines der 2 unabhängig durchgeführten biologischen Experimente. Die wichtigsten Parameter sind zusammenfassend in Tabelle A17 (siehe Anhang) aufgeführt.

C. acetobutylicum ptb::int(87) zu Beginn eine deutlich verlängerte Lag-Phase und erreichte mit 5,69 eine geringere maximale optische Dichte (OD_{600}) als der Wildtyp (7,03). Dabei wies die *ptb*-Integrante eine niedrigere Wachstumsrate ($0,19 \text{ h}^{-1}$) im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle ($0,27 \text{ h}^{-1}$) auf. Weiterhin, wie der Abbildung 3.14 (d) zu entnehmen ist, wurde Butyrat zu keinem Zeitpunkt im zellfreien Kulturüberstand von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* detektiert. Gleichzeitig konnte mit $\sim 70 \text{ mM}$ Acetat ein gegenüber *C. acetobutylicum* ATCC 824 ($\sim 16,5 \text{ mM}$) beutend höherer Titer nachgewiesen werden (Abbildung 3.14, c)). Wie schon in den vorangegangenen Experimenten (Lehmann *et al.*, 2012b), war für die *ptb*-Mutante eine gesteigerte Laktatbildung ($\sim 18,1 \text{ mM}$) über die Acidogenese hinaus zu beobachten. Auffällig war auch hier die drastisch reduzierte Acetonkonzentration ($2,07 \text{ mM}$) sowie die verringerte Produktion von Butanol ($\sim 68 \text{ mM}$) und Ethanol ($\sim 13,5 \text{ mM}$) verglichen mit dem Referenzstamm ATCC 824 ($\sim 108 \text{ mM}$, $\sim 169 \text{ mM}$, $\sim 22 \text{ mM}$) (Anhang, Tabelle A17). Die geringe Lösungsmittelbildung und der um $\sim 38 \%$ verringerte Glukoseverbrauch (Abbildung 3.14, b)) der *ptb*-Integrante ließen vermuten, dass es im Laufe der Kultivierung zu einem sogenannten „Acid Crash“ kam. Bei diesem Phänomen bleibt, bedingt durch einem Übermaß an Säureproduktion, ein signifikanter „Switch“ zur solventogenen Phase aus (Maddox *et al.*, 2000).

Somit konnte der für *C. acetobutylicum ptb::int(87)* bei pH-unkontrollierten Glukose Batch-Fermentationen in MS-MES beschriebene Phänotyp (Lehmann *et al.*, 2012b) bestätigt werden.

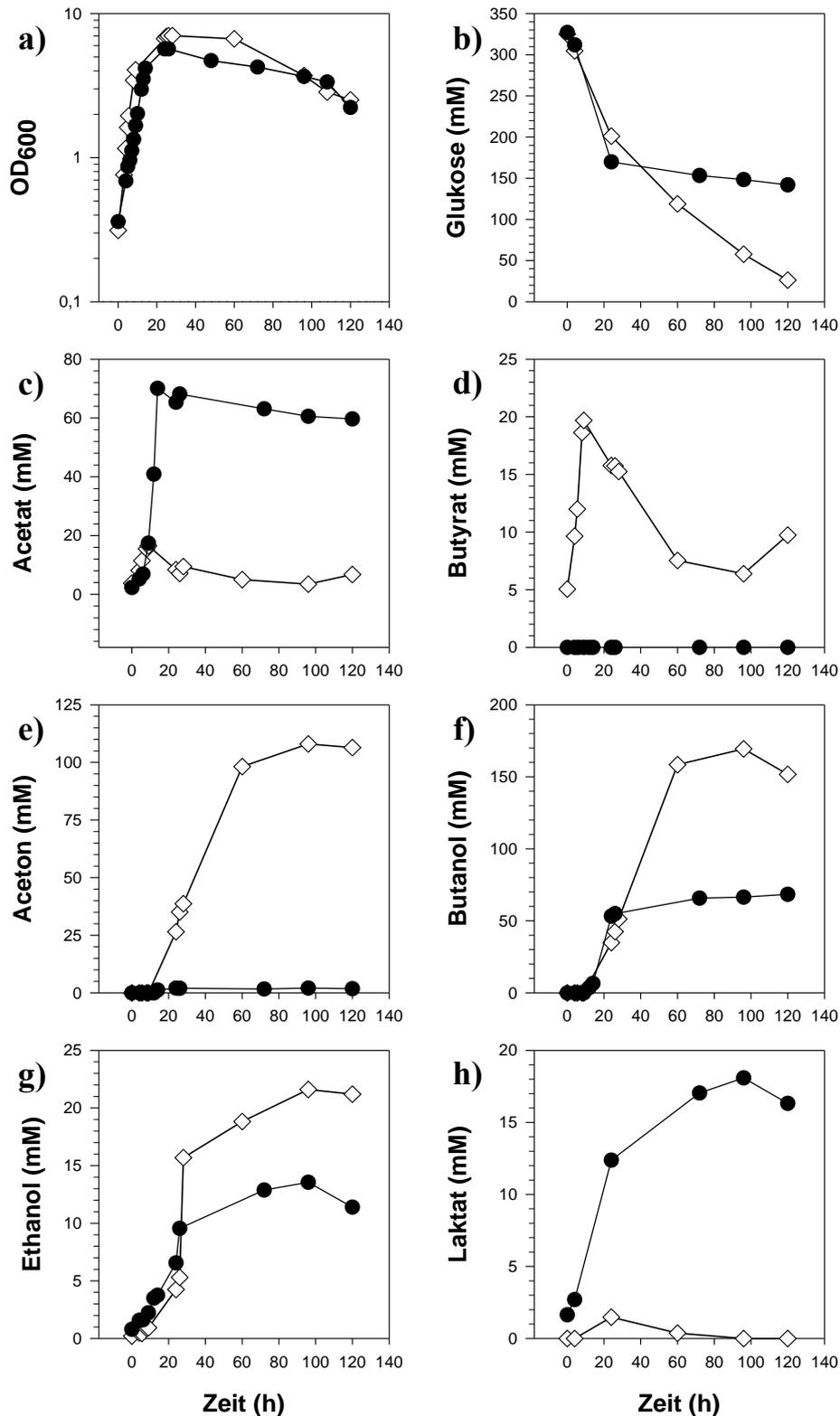


Abbildung 3.14: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (◇) und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* (●) in einer Glukose Batch-Fermentation. Die Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 200 ml MS-MES ohne Acetat kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen, um die Optische Dichte bei 600 nm (a), die Konzentrationen von Glukose (b), Acetat (c), Butyrat (d), Aceton (e), Butanol (f), Ethanol (g) und Laktat (h) zu bestimmen. Bei der gaschromatographischen Bestimmung der Metabolitkonzentrationen wurden interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt (2.6.3). Gezeigt ist ein repräsentatives Einzelexperiment.

3.3.1.1.2 Kontinuierliche Kultivierung

Die Anzucht von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* in kontinuierlicher Kultur und die damit einhergehende Probennahme für die anschließenden DNA Microarray Analysen (2.10) sowie der gaschromatische Bestimmung des Produktspektrums (2.6.3) erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben.

Wie der Abbildung 3.15 zu entnehmen ist, erreichten die Zellen der *ptb*-Integrante nach 108 h acidogenes *steady state* Wachstum bei pH 5,7. Dabei konnte mit ~54 mM Acetat ein im Vergleich zum Wildtyp (~31 mM) um 43 % höherer Titer detektiert werden. Die im zellfreien Kulturüberstand der *ptb*-Mutante bestimmte Glukosekonzentration (~70 mM) spiegelte eine gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 (~51 mM) reduzierte Glukoseaufnahme wieder. Weiterhin wies *C. acetobutylicum ptb::int(87)*, übereinstimmend mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Batch-Fermentationen (3.3.1.1.1) sowie den vorangegangenen Experimenten (Lehmann *et al.*, 2012b), einen Butyrat-negativen Phänotyp auf. Überraschenderweise konnten während des acidogenen Wachstums bei pH 5,7 bis zu 30 mM Butanol nachgewiesen werden. Diese signifikanten Konzentrationen wurden bereits 12 h nach Beginn der kontinuierlichen Kulturführung beobachtet. Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden Proben aus 2 unabhängigen biologischen Experimenten einer Mehrfachbestimmung unterzogen. Nach der Zellernte ($t = 120$ h) für die anschließenden Transkriptionsanalysen (2.10) (*steady state* pH 5,7; Acidogenese), wurde die pH-Regulation zur Einleitung des lösungsmittelbildenden Metabolismus vorübergehend unterbrochen. Der *C. acetobutylicum*-Stamm *ptb::int(87)* benötigte 13,5 h um den pH 4,5 zu erreichen und somit 5 Stunden länger als der Wildtyp (~8,5 h). Im Zuge des „pH-shifts“ stieg die Glukosekonzentration auf einen Wert von 84,15 mM, während die optische Dichte (OD_{600}) von 4,0 auf 3,62 abfiel. Mit dem Erreichen des solventogenen *steady state* Wachstums bei pH 4,5 konnte eine Glukosekonzentration von ~78 mM und eine konstante OD_{600} von ~3,75 für die *ptb*-Mutante detektiert werden.

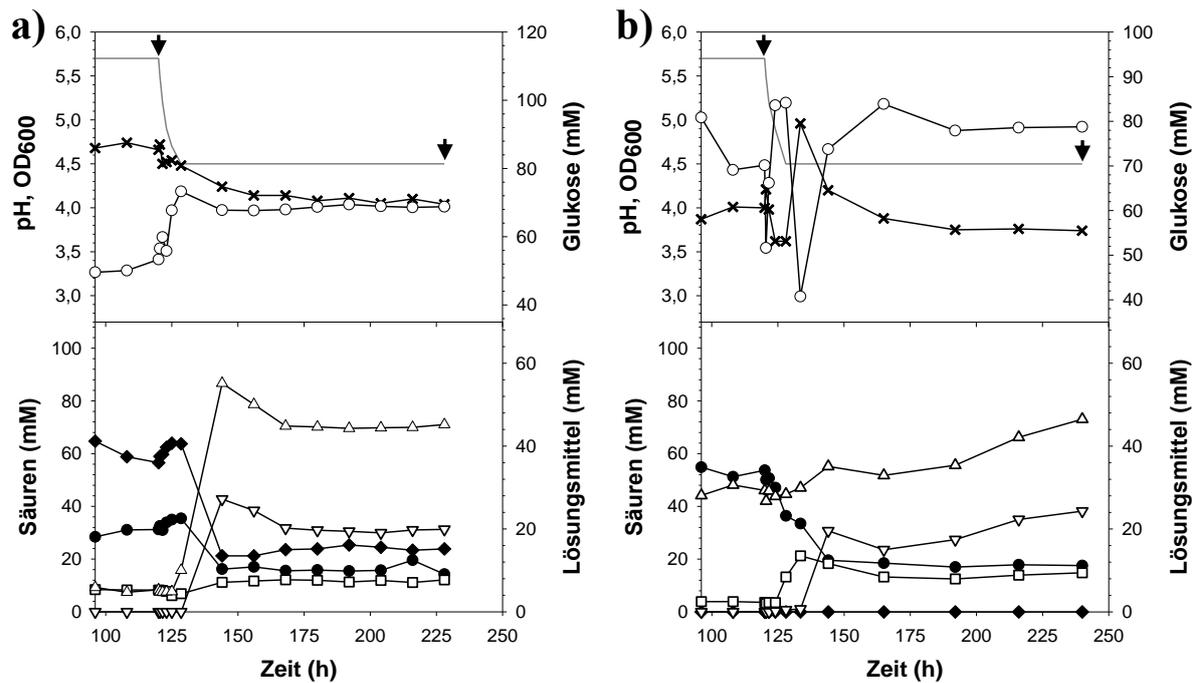


Abbildung 3.15: Fermentationsprofile von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum ptb::int(87)* (b). Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten bis zum Erreichen eines *steady state* Wachstums bei pH 5,7 und pH 4,5 kultiviert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen, um Wachstum (x), pH (–) und Glukosekonzentration (o) verfolgen zu können. Die Fermentationsprodukte Acetat (●), Butyrat (◆), Aceton (▽), Ethanol (□) und Butanol (Δ) wurden mittels Gaschromatographie bestimmt wobei interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden (2.6.3). Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA Microarray Analysen. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

Die Lösungsmittel Aceton (~24) und Butanol (~46 mM) erreichten mit dem Wildtyp vergleichbare Konzentrationen (~20 mM bzw. ~45 mM) (Anhang, Tabelle A16). In Batch-Fermentationen, in denen der pH über einem Wert von 5,0 gehalten wurde, wies die *ptb*-Mutante eine signifikant erhöhte Konzentration an Ethanol (~262 mM) auf (Lehmann *et al.*, 2012b). Während der kontinuierlichen Kultivierung konnte mit dem „pH-shift“ ein vorübergehender Anstieg der Ethanolkonzentration auf ~14 mM bestimmt werden, der finale Titer (~9 mM) war jedoch vergleichbar zum Referenzstamm ATCC 824 (~8 mM). Wie unter 3.3.1.1.1 beschrieben, und bereits durch Lehmann *et al.* (2012b) gezeigt, führen pH-unkontrollierte Batch-Fermentationen in MS-MES ohne Acetat zu erhöhten Laktatkonzentrationen in der *ptb*-Mutante. Unter Phosphat-limitierenden Bedingungen im Chemostaten wurden nur geringfügige Konzentrationen von unter 1 mM (Anhang, Abbildung A33) detektiert. Weiterhin konnte für *C. acetobutylicum ptb::int(87)* mit einer Abnahme der Acetatkonzentration von ~54 mM (pH 5,7) auf ~18 mM (pH 4,5) eine eindeutige Reassimilation der Säure aufgezeigt werden, eine Beobachtung, die sich mit denen aus vorherigen Studien deckt (Lehmann *et al.*, 2012b). Für die vergleichenden

Transkriptomanalysen erfolgte eine zweite Probennahme von Zellen nach 240 h (*steady state* pH 4,5; Solventogenese).

3.3.1.1.3 Kontinuierliche Kultivierung in Gegenwart von Butyrat

Die Anzucht von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* in einem Phosphat-limitierten Chemostaten zeigte ein sehr interessantes Produktspektrum mit großen Unterschieden zu dem der Batch-Fermentationen. Besonders bemerkenswert war, dass die *ptb*-Mutante bereits in der acidogenen Wachstumsphase bei pH 5,7 signifikante Mengen an Butanol produzierte. Dies unterstützt die Hypothese, dass Butanol nicht zwangsläufig aus reassimiliertem Butyrat synthetisiert wird (Lehmann, 2012). Um die Frage zu beantworten, inwiefern extern zugegebenes Butyrat das Fermentationsprofil der *ptb*-Integrante beeinflusst, wurden 20 mM dieser Säure zum Phosphat-limitierten Vorratsmedium (2.3.2) gegeben. Mit der kontinuierlichen Kultivierung in Gegenwart einer konstanten Butyratkonzentration sollte zudem überprüft werden, ob die *ptb*-Mutante in der Lage ist, wie schon in vorangegangenen Fed Batch Fermentationen (Lehmann *et al.*, 2012b), Butyrat aus dem Medium wieder aufzunehmen. Um in diesem Zusammenhang neue Erkenntnisse über den umfangreich diskutierten Mechanismus zur Reassimilation der Säuren zu erhalten, wurde für die DNA Microarray Analysen (2.10) eine zusätzliche Probe am Ende des „shifts“, also unmittelbar mit dem Erreichen des pH-Wertes 4,5 genommen (Abbildung 3.16).

C. acetobutylicum ptb::int(87) benötigte in Gegenwart von 20 mM Butyrat insgesamt 6 Tage ($t = 144$ h), und somit 2 Tage (48 h) mehr als der Wildtyp, um ein stabiles acidogenes *steady state* Wachstum bei pH 5,7 zu erreichen. Dabei wies die Kultur mit einer optischen Dichte von $OD_{600} = \sim 2,8$ und einer Glukosekonzentration von $\sim 67,1$ mM einen deutlichen Unterschied zum Referenzstamm ATCC 824 ($OD_{600} = \sim 4,7$; ~ 51 mM Glukose) auf. Über die Analyse der Fermentationsprodukte konnte eine Acetatkonzentration von ~ 68 mM bestimmt werden, ein gegenüber dem Wildtyp (~ 31 mM) um 54 % und der *ptb*-Integrante ohne externe Butyratzufuhr (~ 54 mM) um 21 % höherer Titer. Die detektierte Butyratmenge (~ 23 mM) entsprach der dem Vorratsmedium zugesetzten Ausgangskonzentration (Abbildung 3.16). Weiterhin waren während des acidogenen Wachstums bei pH 5,7 ~ 5 mM Laktat und erneut signifikante Mengen an Butanol (~ 34 mM) im zellfreien Kulturüberstand nachweisbar (Anhang, Abbildung A33). 170 h nach dem Start der kontinuierlichen Kultivierung wurde die automatische pH-Kontrolle unterbrochen, um den Übergang zum solventogenen Wachstum einzuleiten. Im Zuge des „pH-shifts“ stieg die Glukosekonzentration von $\sim 67,1$ mM auf ~ 95 mM, während die optische Dichte (OD_{600}) auf 2,61 abfiel. In den darauffolgenden 16 h konnte

ein signifikanter Einbruch in der Zelldichte bis auf einen Wert von 1,42 ($t = 192$ h) beobachtet werden, der mit einem Anstieg der Glukosekonzentration im Mediumüberstand auf ~ 133 mM einherging. Jedoch regenerierte sich die Kultur und erreichte einige Stunden später ($t = 240$ h) stabile solventogene *steady state* Bedingungen mit einer $OD_{600} = \sim 3,8$ und einer konstanten Glukosekonzentration von ~ 97 mM. Somit, obgleich in Gegenwart von 20 mM Butyrat der pH in weniger als 6 h auf 4,5 sank, wies die *ptb*-Integrante im Vergleich zur kontinuierlichen Kultivierung ohne externe Butyratzufuhr eine deutlich verlängerte Zeitspanne auf, um ein stabiles *steady state* Wachstum bei pH 4,5 zu erreichen. Während dem solventogenen Wachstum war nur noch ungefähr die Hälfte (~ 10 mM) der über das Vorratsmedium zugeführten 20 mM Butyrat im zellfreien Mediumüberstand nachweisbar (Anhang, Tabelle A16). Folglich, zeigte die *ptb*-Integrante eine eindeutige Aufnahme des extern zur Verfügung gestellten Butyrats, was den Ergebnissen der Butyrat Fed Batch Fermentationen (Lehmann *et al.*, 2012b) entsprach. Die Abnahme der Acetatkonzentration von ~ 68 mM auf ~ 27 mM deutete eine Reassimilation an, während Laktat nicht weiter detektierbar war (Anhang, Abbildung A33). Die Titer von Aceton (~ 10 mM) und Butanol (~ 29 mM) lagen deutlich unter den für den WT (~ 20 mM; ~ 45 mM) sowie der *ptb*-Mutante ohne externe Zufuhr von Butyrat (~ 24 mM; ~ 46 mM) bestimmten Mengen. Ethanol hingegen wies mit ~ 18 mM eine erhöhte Konzentration im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 (~ 8 mM) und der unter 3.3.1.1.2 beschriebenen Kultivierung von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* (~ 9 mM) auf. Für die Transkriptionsanalysen wurde, wie eingangs erwähnt, neben der Probennahme unter solventogenen *steady state* Bedingungen ($t = 264$ h) eine zusätzliche Zellernte am Ende des „pH-shifts“ bei pH 4,5 ($t = 175, 67$ h) durchgeführt (Abbildung 3.16).

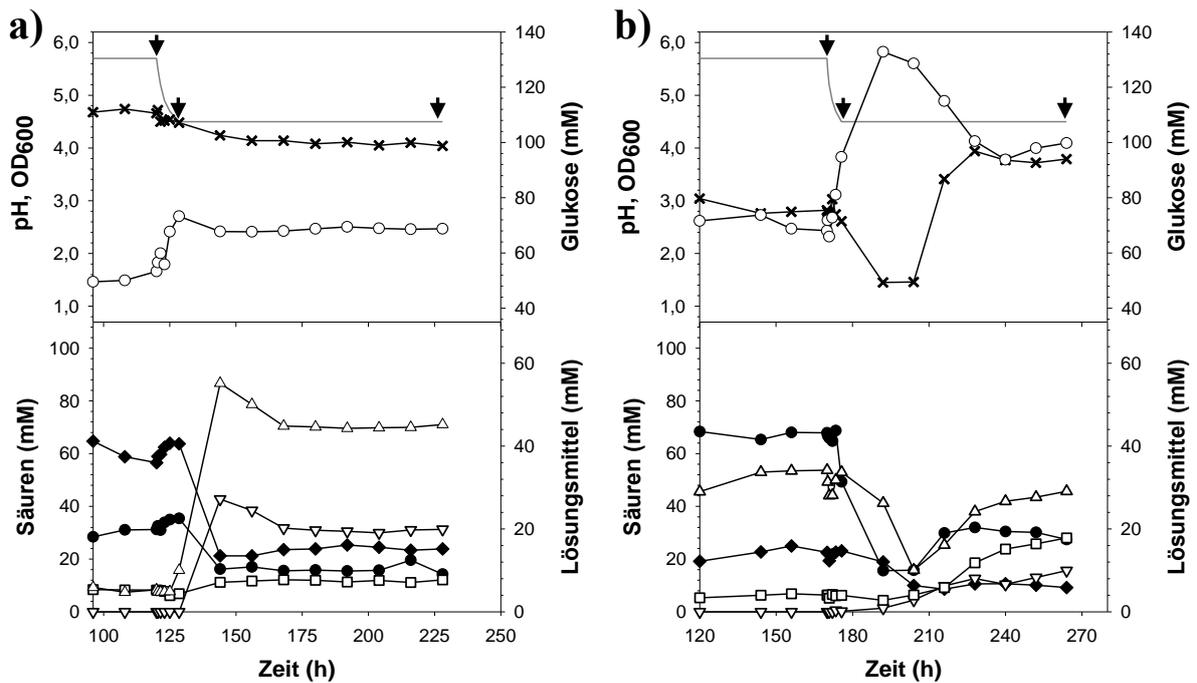


Abbildung 3.16: Fermentationsprofile von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* in Gegenwart von 20 mM Butyrat (b). Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten bis zum Erreichen eines *steady state* Wachstums bei pH 5,7 und pH 4,5 kultiviert. Dem Phosphat-limitierten Vorratsmedium der *ptb*-Integrante wurden 20 mM Butyrat zugesetzt, um eine konstante Zufuhr zu gewährleisten. Es wurden regelmäßig Proben entnommen, um Wachstum (x), pH (–) und Glukosekonzentration (o) verfolgen zu können. Die Fermentationsprodukte Acetat (●), Butyrat (◆), Aceton (▽), Ethanol (□) und Butanol (Δ) wurden mittels Gaschromatographie bestimmt wobei interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden (2.6.3). Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA Microarray Analysen. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

3.3.1.2 *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)*

3.3.1.2.1 Kontinuierliche Kultivierung

Wie eingangs erwähnt, stellte die pH-kontrollierte Kultivierung in einem Phosphat-limitierten Chemostaten den Ausgangspunkt für die Untersuchung des Transkriptom der *hbd*-Integrante auf transkriptioneller Ebene dar. Die Zellan-zucht in Vorkulturen, das Beimpfen des Fermenters, die Zellernte sowie die Analyse der zellfreien Kulturüberstände erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben.

In Abbildung 3.17 ist, neben *C. acetobutylicum* ATCC 824 als Referenz (a), das Fermentationsprofil von *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* gezeigt. Dargestellt ist der Übergang von der acidogenen (pH 5,7) zur solventogenen Wachstumsphase (pH 4,5). Die *hbd*-Mutante benötigte insgesamt 7 Tage ($t = 168$ h), und somit 3 Tage (72 h) mehr als der Wildtyp, um stabile acidogene *steady state* Bedingungen bei pH 5,7 zu erreichen. Dabei wies die Kultur mit ~45 mM Acetat einen im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 (~31 mM) um 31 %

höheren Titer auf. Die für Glukose- (~50 mM) sowie Laktat (< 1 mM) bestimmten Konzentrationen waren vergleichbar mit denen von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (~51 mM bzw. < 1 mM). Butyrat war zu keinem Zeitpunkt im zellfreien Mediumüberstand der *hbd*-Integrante nachweisbar. Jedoch, konnte bereits 12 h nach Beginn der kontinuierlichen Kulturführung ein Konzentration von 49,84 mM Ethanol detektiert werden (nicht gezeigt). Wie der Abbildung 3.17 entnommen werden kann, waren für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* während dem acidogenen *steady state* Wachstum bei pH 5,7 nach 204,75 h ~122 mM Ethanol messbar. Im Anschluss an die erste Probennahme (t = 204,75 h h) für die DNA Microarray Analysen (2.10) (*steady state* pH 5,7; Acidogenese), wurde durch das vorübergehende Abschalten der pH-Kontrolle der „shift“ des pH-Wertes und somit der Übergang zum solventogenen Metabolismus eingeleitet. Der externe pH-Wert sank in 3 h, 50 min von pH 5,7 auf 4,5, was verglichen mit dem Wildtyp (~ 8,5 h) deutlich schneller war. Während des „pH-shifts“ stieg die Glukosekonzentration geringfügig von ~50 mM auf ~56 mM und die optische Dichte (OD₆₀₀) fiel von 3,41 (pH 5,7) auf 3,17 (pH 4,5) ab. Obgleich in den darauffolgenden ~31 h die Zelldichte bis auf einen Wert von 5,24 (t = 240 h) anstieg, konnte kein erhöhter Glukoseverbrauch beobachtet werden. Die im Mediumüberstand zu diesem Zeitpunkt bestimmte Glukosekonzentration betrug ~60 mM. Nach 276 h erreichte die Kultur solventogenes *steady state* Wachstum bei pH 4,5. Wie der Abbildung 3.17 zu entnehmen ist, zeichnete sich dieser Zustand durch eine stabile Biomasse (OD₆₀₀ = ~4,8) und ~62 mM Glukose aus. Unter gleichen Kultivierungsbedingungen offenbarte der Wildtyp eine Optische Dichte von ~4,0 sowie ~69 mM Glukose. Mit ~137 mM Ethanol wies die *hbd*-Integrante eine im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 (~8 mM) etwa 17-fach höhere Konzentration auf. Weiterhin konnten sowohl Butyrat als auch Butanol zu keiner Zeit im Mediumüberstand von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass Acetat in einer Konzentration von bis zu ~37 mM vorlag, und folglich nicht reassimiliert wurde, schien mit der Acetonproduktion zu korrelieren, da nur geringfügige Mengen (~3 mM) im zellfreien Kulturüberstand der *hbd*-Mutante detektiert werden konnten. Es ist bekannt, dass auf dem Megaplasmid pSOL1 die Gene lokalisiert sind, die eine zentrale Rolle in der Aceton- und Butanolproduktion einnehmen (Dürre *et al.*, 2002). Einen Verlust des Megaplasמידs, und damit auch die Fähigkeit zur Bildung von Aceton (Clark *et al.*, 1989; Cornillot *et al.*, 1997b), konnte durch entsprechende Standard-PCRs (2.7.8.2) mit genomischer DNA aus der solventogenen Wachstumsphase (t = 240 h) ausgeschlossen werden (Anhang, Abbildung A35). Im Gegensatz zum *C. acetobutylicum* ATCC824 mit Butanol (~45 mM) und Aceton (~20 mM), stellten in der *hbd*-Integrante Acetat und Ethanol die dominierenden

Gärungsprodukte dar. Die im Mediumüberstand der *hbd*-Mutante bestimmte Laktatkonzentration (< 1 mM) war vergleichbar zum WT (< 1 mM). Für die vergleichenden Transkriptomanalysen erfolgte eine zweite Probennahme von Zellen nach 300 h (*steady state* pH 4,5; Solventogenese).

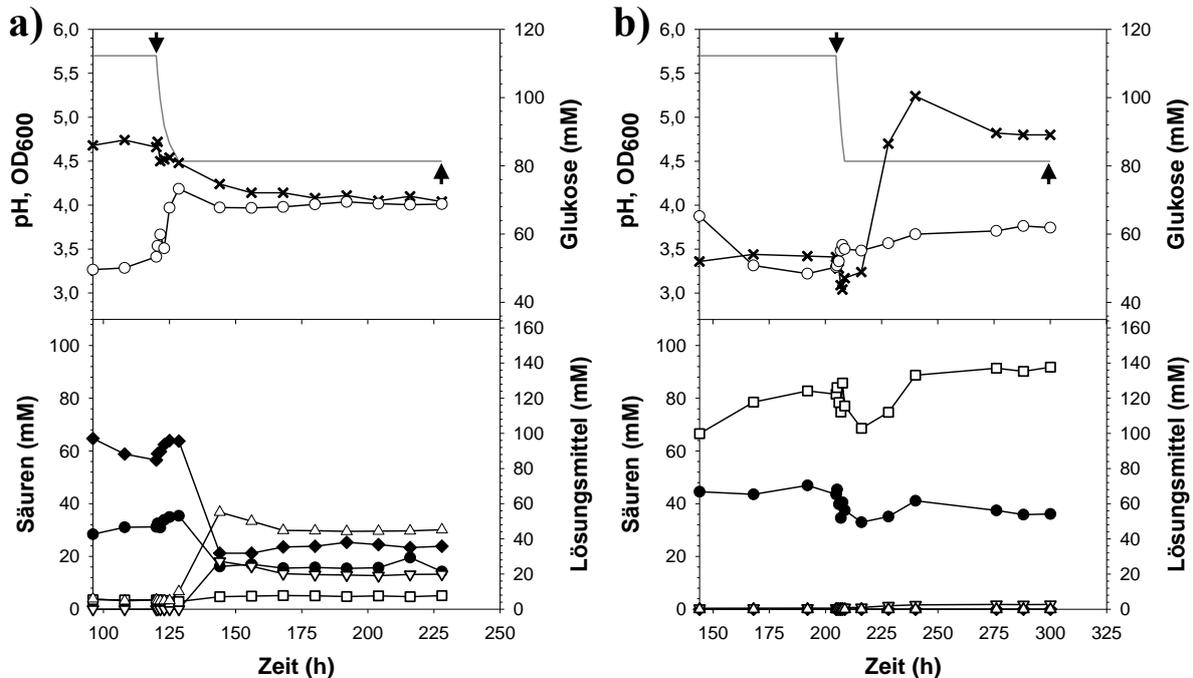


Abbildung 3.17: Fermentationsprofile von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* (b). Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten bis zum Erreichen eines *steady state* Wachstums bei pH 5,7 und pH 4,5 kultiviert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen, um Wachstum (x), pH (–) und Glukosekonzentration (o) verfolgen zu können. Die Fermentationsprodukte Acetat (●), Butyrat (◆), Aceton (▽), Ethanol (□) und Butanol (Δ) wurden mittels Gaschromatographie bestimmt wobei interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden (2.6.3). Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA-Microarray-Analysen. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

3.3.2 Transkriptomanalyse

Für die vergleichende Genexpressionsanalyse von *C. acetobutylicum* ATCC 824 mit den Integrationsmutanten, *C. acetobutylicum ptb::int(80)* und *C. acetobutylicum hbd::int(69)*, wurde aus den jeweiligen Zellproben die Gesamt-RNA wie unter 2.7.2.3 beschrieben isoliert und anschließend die markierte cDNA mit den *probes* auf der Oberfläche des DNA-Microarrays hybridisiert (2.10.2). Um der unterschiedlichen Einbaueffizienz der Farbstoffe in die cDNA-Stränge gerecht zu werden, wurde zu jedem Microarray-Experiment ein Dye-Flip, d.h. eine gegenläufige Cy3-/Cy5-Farbstoffmarkierung, durchgeführt. Der Faktor 3 wurde als ein Schwellenwert für Transkriptionsänderungen verwendet, um das Expressionsverhältnis

eines Gens als signifikant hochreguliert ($\geq 3,0$) oder reprimiert ($\leq -3,0$) definieren zu können (2.10.4). Dabei sei darauf hingewiesen, dass es sich bei den Daten um relative und keine absoluten Werte handelt.

3.3.2.1 *C. acetobutylicum ptb::int(87)*

Mit dem Ziel, neue Erkenntnisse über den Butyratmetabolismus von *C. acetobutylicum* zu gewinnen, erfolgte eine Analyse des Transkriptoms der *ptb*-Mutante, die in einem Chemostaten sowohl unter standardisierten Bedingungen (3.3.1.1.2) als auch mit 20 mM Butyrat im Vorratsmedium (3.3.1.1.3) kultiviert wurde. Um das Expressionsmuster in der Transitionsphase von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* in Gegenwart von Butyrat untersuchen zu können, wurden nicht nur zu *steady state* Konditionen bei pH 5,7 (Acidogenese) und pH 4,5 (Solventogenese), sondern auch am Ende des „pH-shifts“ (pH 4,5), Zellproben entnommen. Für die Interpretation der Microarray Daten erfolgte, wie bereits für die Analyse der Integrationsmutanten des Acetat- und Acetonstoffwechsels (3.2.2), eine Unterteilung in die Untersuchung von Genen des primären Stoffwechsels (3.3.2.1.1) sowie einer Auswahl weiterer, mit einem signifikant exprimierten Transkriptlevel (3.2.2). Die in Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12 aufgeführten Expressionsdaten sind repräsentativ für je 2 unter den jeweiligen Bedingungen durchgeführten unabhängigen biologischen Experimenten und vier (3.3.1.1.2) bzw. sechs (3.3.1.1.3) Hybridisierungsreaktionen (jeweils 2 Microarray-Experimente mit gegenläufiger Cy3-/Cy5-Farbstoffmarkierung). Der vollständige DNA Microarray-Datensatz, kann bei der Array Express-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) unter Verwendung der Zugangsnummer E-MTAB-2058 über die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Publikation (Hönicke *et al.*, 2014) eingesehen werden.

3.3.2.1.1 Analyse der Gene des Primärstoffwechsels

Während des solventogenen *steady state* Wachstums konnte für die *ptb*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Expression (~ 33 -fach) des pSOL1-kodierten Gens CAP0035 (*adhE2*) detektiert werden (Tabelle 3.11). Im Zuge des acidogenen Wachstums war die Transkription dieses Gens $\sim 2,4$ -fach gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 erhöht. In Gegenwart von 20 mM Butyrat wies das *adhE2*-Gen eine signifikant auf der Transkriptebene gesteigerte Expression während der Acidogenese (7,72-fach), am Ende des „pH-shifts“ (5,88-fach) sowie unter solventogenen Bedingungen (87,20-fach) auf. Die Genprodukte des *sol*-Operons (CAP0162-164) zeigten für die unter standardisierten Bedingungen (3.3.1.1.2) kultivierte *ptb*-Integrante keine signifikanten Veränderungen im Expressionsmuster. Mit

Butyrat, war bei pH 5,7 eine gegenüber *C. acetobutylicum* ATCC 824 verringerte mRNA-Menge für die Untereinheiten der CoA-Transferase (CoAT) (CAP0163-164) nachweisbar. Das für die Acetoacetat-Decarboxylase kodierende Gen *adc* (CAP0165) war zu allen Zeitpunkten der Probennahme deutlich im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert (-2,76- bis -4,91-fach) wenn extern über das Vorratsmedium zugeführtes Butyrat gegenwärtig war.

Weiterhin zeigte das ebenfalls auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisierte, und für die Pyruvat-Decarboxylase kodierende Gen *pdh* (CAP0025) in der *ptb*-Mutante eine signifikant verringerte Transkriptmenge (-5,45-fach) unter acidogenen *steady state* Bedingungen. In Gegenwart von Butyrat wies CAP0025 bei pH 5,7 (-6,84-fach) und am Ende des „pH-shifts“ bei pH 4,5 (-6,73-fach) eine reduzierte Expression im Vergleich zum Wildtyp auf.

Wie bereits durch Lehmann *et al.* (2012b) beschrieben, und im Rahmen dieser Arbeit bestätigt (3.3.1.1.1), produziert *C. acetobutylicum ptb::int(87)* während der Batch-Kultivierung in Minimalmedium ohne pH-Kontrolle signifikante Mengen an Laktat. In kontinuierlicher Kultur, wies die *ptb*-Mutante unter standardisierten Bedingungen (3.3.1.1.2) nur geringfügige Mengen an Laktat (< 1 mM) auf und das für die L-Laktat-Dehydrogenase kodierende Gen CAC0267 (*ldh*) zeigte weder während dem acidogenen noch dem solventogenen Wachstum eine signifikante Veränderung im Expressionsmuster. War jedoch Butyrat präsent, konnten im zellfreien Kulturüberstand der *ptb*-Integrierte 5-7 mM Laktat bei pH 5,7 und am Ende des „pH-shifts“ detektiert werden, die während dem solventogenen Wachstum ausgewaschen wurden. Wie der Tabelle 3.11 zu entnehmen ist, war die Transkription von CAC0267 im Zuge der Fermentation 11,36- bis 17,26-fach gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 erhöht.

Des Weiteren wurde während dem solventogenen Wachstum in der *ptb*-Mutante, zum Teil signifikant, die Expression von Genen gesteigert, die an der Umsetzung von Acetyl-CoA zu Butyryl-CoA beteiligte Enzyme kodieren. Die Gene *thlA* (CAC2783), *hbd* (CAC2708), *crt* (CAC2712), *bcd* (CAC2711), *etfA* (CAC2709) und *etfB* (CAC2710) zeigten in Gegenwart von Butyrat, sowohl zu den Zeitpunkten der *steady state* Konditionen als auch am Ende des „pH-shifts“, ein im Vergleich zum Wildtyp erhöhtes Expressionsverhältnis.

Erwartungsgemäß konnte für das Gen der Butyrat-Kinase (*buk*, CAC3075) eine drastische Reduktion im Transkriptlevel detektiert werden, ein vermutlich durch die Insertion des Gruppe-II-Introns in das *ptb*-Gen hervorgerufenen polaren Effekt.

Sowohl mit als auch ohne über das Vorratsmedium zugeführtem Butyrat konnten im Mediumüberstand von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* deutlich erhöhte Mengen an Acetat detektiert werden. Für die vom bicistronischen *pta-ack*-Operon (CAC1742-1743) kodierten

Enzyme der Acetatsynthese (Phosphotransacetylase bzw. Acetatkinase), konnte jedoch kein signifikanter Anstieg des mRNA-Levels gefunden werden.

Tabelle 3.11: Expressionsprofile der zentralen Stoffwechselgene von *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* (*ptb*) in Abwesenheit und in Gegenwart von 20 mM Butyrat. RNA Proben wurden von acidogenen und solventogenen *steady state*-Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Im Rahmen der Kultivierung mit extern über dem Vorratsmedium zugeführtem Butyrat erfolgte eine zusätzliche Zellernte am Ende des „pH-shifts“ bei pH 4,5. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). War das Expressionsverhältnis eines Gens $\geq 3,0$, dann wurde dieses im Vergleich zum Wildtyp signifikant induziert. Bei einem Wert von $\leq -3,0$ lag eine signifikante Repression vor.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	<i>ptb</i>		<i>ptb</i> + 20 mM Butyrat		
			pH 5,7	pH 4,5	pH 5,7	pH 4,5	pH 4,5
			(t = 120h)	(t = 240h)	(t = 170h)	(t = 175,67 h)	(t = 264h)
CAP0025	<i>pdh</i>	Pyruvate decarboxylase	-5,45	-1,72	-6,84	-6,73	-1,55
CAP0035	<i>adhE2</i>	Aldehyde/alcohol dehydrogenase (NADH)	2,41	32,57	7,72	5,88	87,20
CAP0078	<i>thlB</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	-1,27	-1,02	1,54	2,88	-1,10
CAP0162	<i>adhE1</i>	Aldehyde/alcohol dehydrogenase (NADH)	-1,33	-1,15	-1,90	1,57	1,44
CAP0163	<i>ctfA</i>	Butyrate-acetoacetate CoA transferase subunit A	-1,45	-1,43	-3,38	2,22	1,22
CAP0164	<i>ctfB</i>	Butyrate-acetoacetate CoA transferase subunit B	-1,78	-1,05	-4,36	-1,02	1,10
CAP0165	<i>adc</i>	Acetoacetate decarboxylase	1,29	-1,81	-3,91	-4,91	-2,76
CAC0267	<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	2,10	2,05	12,05	17,26	11,36
CAC1742	<i>pta</i>	Phosphotransacetylase	1,31	1,66	2,23	1,41	1,34
CAC1743	<i>ack</i>	Acetate kinase	1,15	1,72	2,36	1,15	1,19
CAC2229	<i>pfor</i>	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase	-1,33	1,21	2,23	-1,04	-1,09
CAC2708	<i>hbd</i>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	1,28	3,14	2,22	1,40	2,33
CAC2709	<i>etfA</i>	Electron transfer flavoprotein subunit A	1,53	3,09	3,37	2,12	2,78
CAC2710	<i>etfB</i>	Electron transfer flavoprotein subunit B	1,38	2,92	2,63	2,21	2,01
CAC2711	<i>bcd</i>	Butyryl-CoA dehydrogenase	1,67	3,09	3,09	2,41	2,93
CAC2712	<i>crt</i>	Enoyl-CoA hydratase	1,59	3,57	2,82	2,64	3,03
CAC2873	<i>thlA</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	1,69	3,12	2,41	-1,74	2,91
CAC3075	<i>buk</i>	Butyrate kinase	-34,86	-32,93	-27,28	-33,55	-22,32
CAC3076	<i>ptb</i>	Phosphate butyryltransferase	-	-	-	-	-
CAC3298	<i>bdhA</i>	Butanol dehydrogenase A	1,36	-1,26	-1,09	-2,05	-2,80
CAC3299	<i>bdhB</i>	Butanol dehydrogenase B	-1,60	-1,15	-1,60	-1,47	-2,03

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

3.3.2.1.2 Analyse des übrigen Transkriptoms

Wie schon für die Analyse der Integrationsmutanten des Acetat- und Acetonstoffwechsels (3.2.2), wurden die Ergebnisse der auf der Transkriptebene erfolgten globalen Veränderungen

in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* anhand von Venn-Diagrammen zusammengefasst (Anhang, Abbildung A36). Vergleichend dargestellt ist die Anzahl aller Gene, die während der Acidogenese bzw. Solventogenese, sowohl in Gegenwart von 20 mM Butyrat als auch unter standardisierten Bedingungen, eine signifikant erhöhte oder verringerte Transkriptmenge aufwiesen.

Interessanterweise konnte erneut eine signifikant veränderte Expression von Genen beobachtet werden, die im Zusammenhang mit dem Schwefelmetabolismus (Abbildung 3.12) stehen. Dazu zählt insbesondere der bereits auffällig gewordenen Gen-Cluster CAC0102-110 (3.2.2). Während dem acidogenen Wachstum bei pH 5,7 wies die *ptb*-Integrierte in Gegenwart von 20 mM Butyrat deutlich erhöhte Transkriptmengen der Gene zur Aufnahme von Sulfat (CAC0106-0108) (~3,7-fach), der Umwandlung intrazellulären Sulfats zu Cystein (CAC0103, CAC0104, CAC0109, CAC0110) und der Biosynthese von Methionin (CAC0102) (~8,4-fach) auf (Tabelle 3.12). Das für ein putatives Ferredoxin kodierende Gen CAC0105 (Nölling *et al.*, 2001) zeigte ein 5,2-fach induziertes Expressionsverhältnis gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824. Am Ende des „pH-shifts“ bei pH 4,5 ($t = 175,67$ h) konnte für die Gene dieses Clusters (CAC0102-110) eine bis zu ~13-fache erhöhte Induktion dokumentiert werden, während unter solventogenen Bedingungen kein signifikanter Einfluss auf die Transkription erfolgte. Weiterhin wies das für die Umwandlung von O-Acetylhomoserin zu Homocystein verantwortliche Gen CAC2783 während der Acidogenese einen signifikanten Anstieg im Transkriptlevel (~7-fach) auf. Ebenso war für CAC2235, der als „Cysteine synthase/cystathionine beta-synthase“ annotierte ORF, sowie CAC0390-91, Gene zur Umsetzung von Cystein zu Homocystein, ein erhöhtes Expressionslevel bei pH 5,7 ($t = 170$ h) sowie im Zuge des pH-shifts ($t = 175,67$ h) nachweisbar. Für die zuletzt genannten Gene konnte in Gegenwart von Butyrat eine signifikant reprimierte mRNA-Menge (~3,3-fach) während dem solventogenen *steady state* Wachstum der *ptb*-Mutante detektiert werden. Wurde *C. acetobutylicum ptb::int(87)* unter standardisierten Bedingungen kultiviert, also ohne Butyrat im Vorratsmedium, zeigten die Gene des Clusters CAC0102-110 ein bis zu ~75-fach, die als „Cystathionine gamma-synthase“ (CAC0390) und „Cystathionine beta-lyase“ (CAC0391) annotierten ORFs ein signifikant um ~6,3-fach erhöhtes Transkriptlevel unter *steady state* Bedingungen bei pH 4,5 ($t = 240$ h) (Tabelle 3.12). Das an der Umsetzung von Sulfid zu Cystein beteiligte Gen *cysK* (CAC2235) lag mit einem gegenüber dem Wildtyp um 2,79-fach erhöhten Expressionsverhältnis (pH 4,5) nur knapp unter dem Schwellenwert, der eine signifikante Induktion definiert.

Wie bereits für die *C. acetobutylicum*-Stämme *pta::int(80)*, *adc::int(180)* sowie *adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)* beobachtet (3.2.2), waren für Zellbeweglichkeit („Motility“) und Chemotaxis kodierende Gene in der *ptb*-Mutante, mit und ohne Butyrat im Vorratsmedium, signifikant auf der Transkriptebene reprimiert (Tabelle 3.12).

Abermals auffällig war auch das Expressionsverhältnis der als „Uncharacterized gene products with unknown function“ annotierten Gene CAP0036 und CAP0037. Für das bicistronische Operon CAP0036-37 konnte, unabhängig von den Kultivierungsbedingungen, in der *ptb*-Integrante eine drastisch reduzierte Expression im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 detektiert werden (Tabelle 3.12).

Weiterhin konnte für *C. acetobutylicum ptb::int(87)*, wie schon bei den Integrationsmutanten des Acetat- und Acetonstoffwechsels (3.2.2), eine signifikant induzierte Transkription der Gene des Mannose/Fruktose- (CAP0066-68) und des Laktose-PTS (CAC2963-66) beobachtet werden. In Gegenwart von Butyrat wiesen die Gene des chromosomal kodierten PTS unter acidogenen *steady state* Bedingungen bei pH 5,7 eine ~15-fach erhöhte Expression gegenüber dem Wildtyp auf. Im Zuge des „pH-shifts“ (t = 175,67 h) sank das Expressionsverhältnis (1,23- bis 2,2-fach), jedoch stieg es wieder erheblich während dem solventogenen Wachstum bei pH 4,5 (21,63- bis 34,72-fach).

Des Weiteren wurden in der *ptb*-Mutante Gene des Stickstoffmetabolismus (CAC0256-61) signifikant auf der Transkriptebene beeinflusst. Die als „nitrogen-fixation genes“ annotierten *nif* Gene (Nölling *et al.*, 2001) kodieren für Komponenten der Nitrogenase und zeigten, sowohl mit als auch ohne Butyrat im Vorratsmedium, eine gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Induktion (Tabelle 3.12).

Interessanterweise war für *C. acetobutylicum ptb::int(87)* während dem acidogenen Wachstum (pH 5,7) in Gegenwart von Butyrat eine im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 erhöhte Transkriptmenge der Gene CAC0980 (~4,8-fach) und CAC0981 (~4,3-fach), die für eine Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*) sowie dessen Aktivierungsenzym (*pflA*) kodieren, nachweisbar. Zum Zeitpunkt des „pH-shifts“ (t = 175,67 h) stieg das Transkriptlevel der Gene des putativen Operons CAC0980-81 (~19,8-fach). Unter solventogenen *steady state* Bedingungen bei pH 4,5 lag das jeweilige Expressionsverhältnis nur knapp unter dem Schwellenwert, der eine signifikante Induktion definiert.

Im Zuge der Kultivierung mit 20 mM Butyrat konnte während dem solventogenen Wachstum (t = 264 h) für das putative Operon CAC2542-44 (~5,2-fach) eine signifikant gesteigert Transkription dokumentiert werden. Dabei handelt es sich um die FAD/FMN-enthaltende Dehydrogenase (CAC2542) mit den α - und β -Untereinheiten des Elektronen-übertragenden

Flavoproteins (*etfA* (CAC2543) und *etfB* (CAC2544)). Die physiologische Rolle dieses Gen-Clusters ist jedoch bislang unbekannt.

Tabelle 3.12: Ausgewählte Gene, die in *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* ein im Vergleich zum Wildtyp ATCC 824 signifikant erhöhtes ($\geq 3,0$) oder reprimiertes ($\leq -3,0$) Transkriptlevel aufwiesen. RNA Proben wurden von acidogenen bzw. solventogenen *steady state*-Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Im Rahmen der Kultivierung mit extern über dem Vorratsmedium zugeführtem Butyrat erfolgte eine zusätzliche Zellernte am Ende des „pH-shifts“ bei pH 4,5. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Durch „n.d.“ (nicht definiert) wurden Gene gekennzeichnet, die kein Transkript aufwiesen oder die angewandten Filterkriterien nicht erfüllten.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	<i>ptb</i>		<i>ptb</i> + 20 mM Butyrat		
			pH 5,7	pH 4,5	pH 5,7	pH 4,5	pH 4,5
			(t = 120 h)	(t = 240 h)	(t = 170 h)	(t = 175,67 h)	(t = 264 h)
CAP0036		Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i>	-251,95	-5,21	-131,46	-295,77	-53,63
CAP0037		Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i>	-246,79	-4,35	-111,19	-271,72	-42,86
CAP0066		ptna Mannose-specific phosphotransferase system component IIAB	88,85	n.d.	56,20	n.d.	190,35
CAP0067		manY/levF Mannose/fructose-specific phosphotransferase system component IIC	132,24	126,91	33,61	n.d.	151,77
CAP0068		ptnd Mannose-specific phosphotransferase system component IID	63,84	n.d.	30,49	n.d.	50,07
CAP0079	<i>thlr</i>	HTH transcriptional regulator TetR/AcrR family	-1,01	1,17	1,07	3,64	1,07
CAC0102		O-acetylhomoserine sulfhydrylase	1,88	17,67	8,39	13,20	-1,29
CAC0103	<i>cysC</i>	Adenylylsulfate kinase	2,04	44,01	13,55	13,07	-1,21
CAC0104		Adenylylsulfate reductase	2,37	49,54	14,62	12,63	-1,13
CAC0105	<i>fer</i>	Ferredoxin	1,92	26,80	5,20	12,05	-1,14
CAC0106		ABC-type probable sulfate transporter, periplasmic binding protein	1,81	6,21	3,68	11,54	1,04
CAC0107		ABC-type sulfate transporter, ATPase component	1,85	62,96	3,84	5,62	1,37
CAC0108		ABC-type probable sulfate transporter, permease protein	n.d.	n.d.	3,69	4,94	1,46
CAC0109	<i>cysD</i>	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	1,56	74,92	1,82	6,42	1,49
CAC0110	<i>cysN</i>	GTPase, sulfate adenylate transferase subunit 1	1,93	34,72	-1,20	6,15	1,37
CAC0256	<i>nifD</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein, alpha chain (nitrogenase component I) gene nifD	49,41	4,87	14,50	28,91	4,52
CAC0257	<i>nifK</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein,	9,86	2,57	10,79	4,05	3,76

		beta chain, gene nifK					
CAC0258	<i>nifE</i>	nitrogenase molybdenum-cofactor biosynthesis protein NifE	38,18	5,95	21,54	15,86	8,19
CAC0259		multifunctional nitrogenase iron molybdenum cofactor biosynthesis protein NifN/nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta NifK/nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein NifB	37,11	7,41	27,28	17,01	8,28
CAC0260	<i>nifV</i>	homocitrate synthase, omega subunit nifV (nivO)	27,21	7,48	19,04	11,52	8,29
CAC0261	<i>nifV</i>	homocitrate synthase subunit alpha NifV	15,13	4,07	9,95	3,07	3,21
CAC0304	<i>motA</i>	chemotaxis protein MotA	-3,76	-1,99	1,13	-5,74	-3,19
CAC0305	<i>motB</i>	chemotaxis protein MotB	-3,77	-2,50	-1,17	-3,25	-3,12
CAC0390		Cystathionine gamma-synthase	1,27	6,03	4,71	8,72	-4,02
CAC0391		Cystathionine beta-lyase	1,73	6,64	5,45	3,51	-2,59
CAC0443		methyl-accepting chemotaxis protein	-10,17	n.d.	-3,20	n.d.	n.d.
CAC0741		methyl-accepting chemotaxis protein	-3,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CAC0980	<i>pflB</i>	Pyruvate-formate-lyase	1,76	2,10	4,76	18,54	2,88
CAC0981	<i>pflA</i>	Pyruvate-formate-lyase-activating enzyme	2,58	2,56	4,32	21,02	2,75
CAC1233	<i>cheV</i>	chemotaxis protein CheV	-3,79	-2,69	-1,48	n.d.	-4,28
CAC1547	<i>trxA</i>	Thioredoxin	-2,91	-1,30	1,48	1,83	-3,57
CAC1548	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	-4,76	-2,44	1,99	2,12	-3,48
CAC1549	<i>bsaA</i>	Glutathione peroxidase	-2,10	-2,48	-2,47	1,73	-4,58
CAC1570	<i>bsaA</i>	Glutathione peroxidase	-2,62	-2,30	2,05	-1,19	-3,48
CAC1634		Flagellin	-3,49	-2,66	-1,31	-9,60	-4,93
CAC2154	<i>flgE</i>	flagellar hook protein FlgE	-3,08	-1,09	-1,03	-4,08	-1,74
CAC2156	<i>flgD</i>	lagellar hook assembly protein FlgD	-3,57	1,11	-1,19	-3,14	-1,84
CAC2203	<i>hag</i>	hook-associated protein, flagellin family	-5,12	-2,45	-1,43	-6,45	-7,43
CAC2211	<i>flgL</i>	Flagellin, flagellar hook-associated protein 3 FlgL	-3,04	-2,22	1,01	-3,85	-3,84
CAC2212	<i>flgK</i>	flagellar hook-associated protein FlgK	-3,59	-2,52	-1,52	-2,65	-4,48
CAC2214	<i>flgM</i>	flagellin synthesis regulator FlgM	-3,50	-1,99	-1,29	-2,91	-4,55
CAC2215	<i>fliY</i>	flagellar motor switch protein	-25,45	-12,33	-25,42	-14,22	-12,33
CAC2216	<i>fliM</i>	flagellar switch protein FliM	-9,02	-14,27	-33,95	-15,10	-12,98
CAC2217	<i>cheW</i>	chemotaxis signal transduction protein CheW	-25,23	-16,12	-40,57	-25,54	-18,55
CAC2218	<i>cheY</i>	chemotaxis signal receiving protein CheY	-27,18	-17,09	-37,21	-27,86	-18,00
CAC2219	<i>cheC</i>	chemotaxis protein CheC	-25,07	-13,08	-26,37	-18,57	-14,62
CAC2221	<i>cheR</i>	chemotaxis protein CheR	-1,81	-2,13	-3,26	-6,76	-3,39
CAC2235	<i>cysK</i>	Cysteine synthase/cystathionine beta-synthase	-1,05	2,79	4,37	8,49	1,54
CAC2542		FAD/FMN-containing dehydrogenase	1,93	2,20	1,82	1,93	5,73
CAC2543	<i>etfA</i>	Electron-transferring flavoprotein large subunit	1,97	2,06	1,76	1,76	4,79

CAC2544	<i>etfB</i>	Electron-transferring flavoprotein small subunit	1,82	1,52	2,20	1,90	5,15
CAC2746		methyl-accepting chemotaxis protein	-3,42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CAC2774		methyl-accepting chemotaxis protein	-4,84	-1,82	n.d.	n.d.	n.d.
CAC2783	<i>cysD</i>	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	-1,04	11,81	7,01	1,63	1,24
CAC2963	<i>lacG</i>	6-Phospho-Beta-D-Galactosidase	14,38	13,90	17,83	1,23	21,63
CAC2964	<i>lacE</i>	PTS system lactose-specific enzyme IIBC	15,01	18,85	11,00	1,36	24,23
CAC2965	<i>lacF</i>	PTS system lactose-specific enzyme IIA	24,07	29,03	15,31	n.d.	34,72
CAC2966	<i>lacR</i>	Lactose phosphotransferase system repressor lacR	19,05	n.d.	17,65	2,20	n.d.
CAC3157	<i>trpA</i>	Tryptophan synthase alpha chain	-1,04	-4,11	-1,02	-97,96	31,04
CAC3158	<i>trpB</i>	Tryptophan synthase subunit beta	-1,00	-3,65	1,74	-61,58	35,21
CAC3159	<i>trpF</i>	Phosphoribosylanthranilate isomerase	1,02	-2,83	1,21	-133,66	28,93
CAC3160	<i>trpC</i>	Indole-3-glycerol phosphate synthase	1,04	-2,09	1,58	-91,00	40,81
CAC3161	<i>trpD</i>	Anthranilate phosphoribosyltransferase	1,02	-1,83	1,49	-178,59	38,79
CAC3162	<i>pabA</i>	Para-aminobenzoate synthase component II	-1,08	-1,76	1,69	-73,42	39,64
CAC3163	<i>parB</i>	anthranilate synthase component I	1,20	-1,23	1,17	-151,59	36,19
CAC3388		methyl-accepting chemotaxis protein	-3,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

3.3.2.2 *C. acetobutylicum hbd::int(69)*

Wie eingangs erwähnt, sollte im Rahmen dieser Arbeit der in einer vorherigen Studie (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011) unter Verwendung des ClosTron-Systems (Heap *et al.*, 2007) erzeugte Stamm *C. acetobutylicum hbd::int(69)* mit dem Wildtyp ATCC 824 auf transkriptioneller Ebene mittels DNA Microarray untersucht werden. Die für den acidogenen (pH 5,7) und solventogenen (pH 4,5) Gärungsstoffwechsel der *hbd*-Integrationsmutante repräsentativen Expressionsdaten basieren auf einem biologischen Experiment. Die detaillierten Ergebnisse aller signifikant induzierten oder reprimierten Gene sind im Anhang (Tabelle A18, Tabelle A19, Tabelle A20, Tabelle A21) dokumentiert.

3.3.2.2.1 *Steady state*-Transkriptom bei pH 5,7

Insgesamt wurden in Zellen der acidogenen Wachstumsphase bei pH 5,7 222 Gene identifiziert, die eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant auf der Transkriptebene beeinflusste Expression aufwiesen. Dabei konnte für 104 Gene (2,7 %) eine signifikant erhöhte Induktion ($\geq 3,0$) detektiert werden, 120 Gene (3,1 %) wiesen eine deutlich verringerte Transkription ($\leq -3,0$) auf (Anhang, Tabelle A18, Tabelle A19). Die Mehrheit der Gene (80,2 %) offenbarte kein um mindestens den Faktor 3 verändertes Expressionslevel,

19,8 % der Gene zeigten kein Transkript oder wurden im Zuge der Auswertung der Daten des DNA Microarrays über die erforderlichen Filterkriterien (2.10.4) aussortiert.

Von den insgesamt 104 Genen in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* mit einer signifikant gegenüber dem Wildtyp verstärkten Expression bei pH 5,7 wurden 9 vom Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997a) kodiert. Dabei wiesen die für das Mannose/Fruktose-PTS kodierenden Gene CAP0066-68 (Servinsky *et al.*, 2010) den höchsten Transkriptanstieg (~346-fach) auf. Weiterhin konnte für die NADH-abhängige Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2 (*adhE2*, CAP0035) ein gegenüber dem Wildtyp stark induziertes Expressionslevel (~25-fach) dokumentiert werden. Von den chromosomalen kodierten Genen zeigten unter acidogenen *steady state* Bedingungen u. a. eine „eine „NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (CAC3657) (~3,4-fach) sowie CAC0771-73 (~9,1-fach), ein putatives Operon des Cobaltmetabolismus, ein signifikant erhöhtes Expressionsverhältnis gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824. Cobalt wird zur Biosynthese von Cobalamin (Vitamin B₁₂) benötigt (Paredes *et al.*, 2004; Rodionov *et al.*, 2003), einem Co-Faktor für eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen wie bspw. der Transmethylierung zur Bildung von Methionin aus Homocystein (Halpern, 1985; Jeter & Roth, 1987). Interessanterweise, konnte in der *hbd*-Integrante für das Protein CAC0578 (*methH*), welches als „Cobalamine-dependent methionine synthase I (methyltransferase and cobalamine-binding domain)“ annotiert ist, eine ~3,6-fach erhöhte mRNA-Menge bestimmt werden. Mit CAC0014 (~12,4-fach), CAC0015 (~12-fach) und dem putativen Operon CAC0390-91 (~4,4-fach) zeigten weitere Gene eine signifikant gesteigerte Transkription, die im Schwefelmetabolismus von *C. acetobutylicum* (Abbildung 3.12) involviert sind. Auffällig war auch das als „seryl-tRNA synthetase“ annotierte Gen CAC0017 (*serS*) (~12,8-fach), für das gemeinsam mit den Genen *serC* (CAC0014) und *serA* (CAC0015) eine deutlich verstärkte Expression im Zuge der Transition zur Solventogenese beobachtet werden konnte (Grimmler *et al.*, 2011; Schaffer *et al.*, 2002). Des Weiteren wurden in der *hbd*-Mutante die Gene *lacG* (CAC2963) (~55,4-fach), *lacE* (CAC2964) (~66,4-fach) und *lacF* (CAC2965) (~88,7-fach) des Laktose-PTS (Servinsky *et al.*, 2010) erheblich in ihrer Expression induziert. Die vergleichende Genomanalyse ergab zudem ein im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 signifikant erhöhtes Expressionsverhältnis des *aro*-Operons (CAC0892-99). Dieses kodiert Gene für die Biosynthese von Chorismat, einem Verzweigungspunkt und Schlüsselintermediat zur Bildung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Chorismat wird zudem für die Synthese von Menaquinon (Vitamin K₂) benötigt

(Bentley, 1990), welches eine essentielle Rolle in einzelnen anaeroben Elektronentransportsystemen von *E.coli* einnimmt (Daruwala *et al.*, 1997).

Neun der insgesamt 120 Gene, die unter acidogenen *steady state* Bedingungen bei pH 5,7 in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* ein im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 signifikant reprimiertes Transkriptlevel ($\leq -3,0$) aufwiesen, wurden vom Megaplasmid pSOL1 kodiert. Dazu gehören u.a. das für die Pyruvat-Decarboxylase kodierende *pdh*-Gen (CAP0025) (~-3,1-fach) sowie die als „Uncharacterized gene products with unknown function“ annotierten Gene CAP0036 (~-522,2-fach) und CAP0037 (~-383,8-fach). Letztere wurden bereits in den Mutanten-Stämmen *pta::int(80)* sowie *adc::int(180)*ΔRAM-*pta::int(80)* signifikant in ihrem Expressionsverhältnis beeinflusst (3.2.2). Unter denen die auf dem Chromosom lokalisiert sind befanden sich überwiegend Gene, die für Flagelline und Proteine der Chemotaxis kodieren. So konnte in der *hbd*-Integrierte eine signifikant verringerte mRNA-Menge u.a. für die als „chemotaxis proteins“ annotierten Gene CAC0118 (*cheA*), CAC0119 (*cheW*), CAC0304 (*motA*), CAC0305(*motB*), CAC1233 (*cheV*), das putative Operon CAC1600-01, CAC1634, das Flagellin FlaC (bzw. „Hook-associated flagellin protein Hag“, CAC2203), CAC2204, die in einem gemeinsamen Operon lokalisierten Gene CAC2205-14 und CAC2216 (FliM) detektiert werden. Mit CAC1561 (~-3,4-fach), CAC2174-75 (~-3,7-fach), CAC2523 (~-4,4-fach) und CAC2589 (~-3,3-fach) wurden Gene identifiziert, die für Glykosyltransferasen kodieren. Wie u. a. für das Flagellin FlaC beschrieben (Lyristis *et al.*, 2000), sind Glykosyltransferasen in der Lage Proteine durch Glykosylierung zu modifizieren. Ebenso konnte in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* für das Gen CAC0078 (*agrB*) (~-15,7-fach) des sogenannten *agr*-Operons ein signifikant reprimiertes Transkriptlevel aufgezeigt werden. Bei diesem ORF handelt es sich um ein mit dem „Quorum sensing“ und der Sporulation in Verbindung stehendes Regulator-Protein (Cooksley *et al.*, 2010; Jabbari *et al.*, 2013).

3.3.2.2.2 *Steady state*-Transkriptom bei pH 4,5

Unter solventogenen *steady state* Bedingungen bei pH 4,5 konnte für 171 Gene (4,5 %) ein im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhtes Expressionsverhältnis identifiziert werden, während 130 Gene (3,4 %) ein deutlich reprimiertes Transkriptlevel ($\leq -3,0$) aufwiesen (Anhang, Tabelle A20, Tabelle A21). Insgesamt 86,4 % der Gene zeigten kein um den Faktor 3 verändertes Expressionsverhalten, 5,7 % der Gene wiesen kein Transkript auf oder erfüllten nicht die angewandten Filterkriterien.

Insgesamt 9 der 171 verstärkt exprimierten Gene ($\geq 3,0$) liegen auf dem Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997a). Dabei zeigten die Gene CAP0067 (~211,7-fach) und CAP0068

(~62,5-fach), die Teil des putativen Operons für das Mannose/Fruktose-PTS (CAP0066-68) sind, zusammen mit dem Gen CAP0035 (*adhE2*) (~60,1-fach), dass für die NADH-abhängige Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2 kodiert, die stärkste Induktion. Unter den chromosomal kodierten Genen befanden sich u.a. die des putativen Operons CAC0014-17 (~10,3-fach) zur Biosynthese von Serin (Schaffer *et al.*, 2002). Eine im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 signifikant auf der Transkriptebene induzierte Expression konnte auch für die Gene CAC0404 (~4,1-fach) und CAC0579 (~3,6-fach), die jeweils für eine „Serine protein kinase“ kodieren, detektiert werden. Besonders auffällig in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* war die hohe Anzahl an signifikant induzierten Sporulationsgenen bzw. verantwortlichen Sigmafaktoren. Dazu gehörten neben Genen die direkt in die Sporulationskaskade involviert sind auch solche, die eine potentielle Funktion in der Zell-Umhüllung („Cell envelope biogenesis“) einnehmen. Mehr als 30 Gene dieser Kategorie konnten für die *hbd*-Mutante dokumentiert werden, obgleich Zellen in einer kontinuierlichen Kultur keine Sporen oder Vorsporen ausbilden (Janssen *et al.*, 2010). So zeigten im Vergleich zum Wildtyp u.a. die putativen Operons CAC0469-70 (~5,7-fach) und CAC0613-614 (~3,3-fach), die für das „Spore maturation protein A/B“ bzw. das „Spore coat protein F“ kodieren, CAC0581 (*spoVR*) (~3,7-fach) und das Operon CAC1337-38 (~5,6-fach), dessen Proteine als „Spore coat protein COTJB“ und „Spore coat protein COTJC“ annotiert sind, ein signifikant erhöhtes Transkriptlevel. Ebenso signifikant induziert wurden die Transkriptmengen der Gene des Sigmafaktors K, CAC1689 (~4,1-fach), des Sigmafaktors E, CAC1695 (*sigE*) (~4,3-fach), des Sigmafaktors G, CAC1696 (*sigG*) (~3,4-fach) sowie von CAC2086 (~3,9-fach), dem putativen Operon CAC2087-93 (~4,6-fach) und CAC2859 (*spoIID*) (~3,1-fach), Gene die allesamt für verschiedene Proteine vom Typ „Stage III sporulation“ kodieren. Weiterhin konnte eine deutlich gegenüber dem Wildtyp verstärkte Expression für die Gene CAC2963-65 (~31,1-fach), die für Komponenten des Laktose-PTS (Servinsky *et al.*, 2010) kodieren, dokumentiert werden.

Von den insgesamt 130 Genen, die in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* während dem solventogenen Wachstum bei pH 4,5 ein gegenüber dem Wildtyp signifikant verringertes Expressionslevel offenbarten, wurden 16 vom Megaplasmid pSOL1 kodiert (Anhang, Tabelle A21). Unter diesen Genen konnten neben einer „Glycosyltransferase“ (CAP0045) (~9,6-fach), einem Operon für Xylanasen (CAP0053-54) (~3,4-fach), und 2 „Alpha-amylasen“ (*amyA*), CAP0098 (~5,7-fach); CAP0168 (~4,8-fach)) u. a. auch die des *sol*-Operons (CAP0162-64) (~18,05) gefunden werden. Für das Gen der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*, CAP0165) war hingegen keine signifikante Veränderung im Expressionsverhältnis

nachweisbar. Am auffälligsten war jedoch die im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 drastisch reprimierte Transkription des bicistronischen Operon CAP0036-37 (~204,9-fach), wie es bereits für *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* beobachtet werden konnte (3.2.2). Weitere gegenüber dem Wildtyp stark verringerte Transkriptmengen wurden u.a. für die als „Endoglucanases“ annotierten chromosomalen Gene CAC0826 (~3,6fach), CAC0910-119 (~22,8-fach) und CAC3469 (~7-fach), für Gene des Stickstoffmetabolismus (CAC0256-61) (~5,9-fach) sowie für Gene des *aro*-Locus (CAC0893-98) (~3,5-fach) bestimmt. Mit bspw. CAC0304-05 (~8,8-fach), CAC1233 (*cheV*) (~10,2-fach), dem putativen Operon CAC1600-01 (~7,8-fach), CAC1634 (~91,3-fach) oder CAC2203-14 (~6,9-fach) wurden zudem zahlreiche Gene signifikant in ihrer Expression reprimiert, deren Produkte in der Zellbeweglichkeit („Motility“) und Chemotaxis involviert sind (Anhang, Tabelle A21).

3.4 Untersuchung der Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2

In *C. acetobutylicum* existieren mehrere verschiedene Aldehyd- und Alkohol-Dehydrogenasen, jedoch ist nur relativ wenig bekannt bezüglich ihrer individuellen Funktionen bei der Bildung der Lösungsmittel Ethanol und Butanol. Anhand der Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnten zwei paraloge Gene der Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase (*adhE1*, *adhE2*) identifiziert werden. Während die AdhE1 (CAP0162) das Hauptenzym für die Alkoholproduktion unter solventogenen Wachstumsbedingungen darstellt (Cooksley *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 1993; Grimmer *et al.*, 2011; Nair *et al.*, 1994; Papoutsakis, 2008), wurde der AdhE2 (CAP0035) eine Rolle in alkohologenen Kulturen (nahezu neutraler pH, hohes NADH/NAD⁺-Verhältnis) zugeschrieben (Fontaine *et al.*, 2002). Neben den hier gemachten Beobachtungen, zeigte CAP0035 bereits in vorangegangenen Studien mehrfach eine signifikant auf der Transkriptionsebene beeinflusste Expression (Alsaker *et al.*, 2010; Grimmer *et al.*, 2011; Hönicke *et al.*, 2012; Janssen *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Vor diesem Hintergrund sollte der von der Universität Nottingham zur Verfügung gestellte Stamm *C. acetobutylicum* *adhE2::int(696)* (2.2) im Rahmen dieser Arbeit in einem Chemostaten kultiviert und anschließend mit Hilfe von DNA Microarrays umfangreich analysiert werden.

3.4.1 Charakterisierung der *adhE2*-Integrationsmutante

Die physiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* *adhE2::int(696)* erfolgte in einem pH-kontrollierten Chemostaten mit einem Kulturvolumen von 0,75 l unter

Phosphatlimitierung (2.3.2). Die Anzucht des Fermenters, die anschließenden DNA Microarray Analysen (2.10), die Gaschromatische Analyse des Produktspektrums (2.6.3) sowie die enzymatische Konzentrationsbestimmung von Glukose (2.6.4) und Laktat (2.6.5) erfolgten gemäß dem Methodenteil und wie unter 3.2.1 beschrieben.

Die Abbildung 3.18 ist repräsentativ für eines der 3 unabhängig durchgeführten biologischen Experimente und zeigt, neben *C. acetobutylicum* ATCC 824 als Referenz (a), das Fermentationsprofil von *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* (b). Nach etwa 4 Tagen ($t = 96$ h) erreichte die *adhE2*-Integrante ein acidogenes *steady state* Wachstum bei pH 5,7. Dabei wies die Kultur eine konstante Zelldichte von $OD_{600} = \sim 3,83$ und stabile Produktkonzentrationen von ~ 33 mM Acetat und ~ 59 mM Butyrat auf, die vergleichbar mit denen des Wildtyps (~ 31 mM Acetat, ~ 57 mM Butyrat) waren. Im Anschluss an die erste Probennahme ($t = 120$ h) für die DNA Microarray Analysen (2.10) (*steady state* pH 5,7; Acidogenese), wurde die pH-Kontrolle vorübergehend inaktiviert, um den Übergang zum solventogenen Wachstum einzuleiten. Durch natürliche Ansäuerung des Mediums sank der externe pH der Kultur innerhalb von $\sim 7,5$ h von pH 5,7 auf pH 4,5, einer gegenüber dem Wildtyp ($\sim 8,5$ h) vergleichbaren Zeit. Im Zuge des „pH-shifts“ stieg die Glukosekonzentration auf einen Wert von 66,85 mM, während die optische Dichte (OD_{600}) auf 3,6 abfiel. Innerhalb der darauffolgenden 48 h konnte für die *adhE2*-Mutante eine dunkle, leicht schwarze Verfärbung der Kultur bzw. der sedimentierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abbildung A37), der mit einem geringfügigen Anstieg in der Biomasse auf $OD_{600} = 3,88$ einherging. Ein dazu leicht fauliger Geruch ließ vermuten, dass es zu einer verstärkten Produktion von Eisen(II)-sulfid kam, einem Produkt der Sulfidisierung von Fe^{2+} und dem bei der Sulfatreduktion gebildeten Hydrogensulfid (HS^-). Ein erneutes *steady state* Wachstum bei pH 4,5 wurde ca. 65 h ($t = 192$ h) nach dem wieder Einschalten der pH-Kontrolle erreicht. Die Glukosekonzentration im zellfreien Kulturüberstand der *adhE2*-Integrante stieg auf ~ 75 mM, die Zelldichte blieb stabil bei $OD_{600} = \sim 3,66$. Die Lösungsmittel Butanol und Ethanol erreichten in *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* unter solventogenen Wachstumsbedingungen bei pH 4,5 ~ 28 mM bzw. ~ 4 mM, Konzentrationen die verglichen mit dem Wildtyp (~ 45 mM; ~ 8 mM) signifikant reduziert waren. Interessanterweise wurde mit ~ 19 mM Aceton ein gegenüber dem Referenzstamm ATCC824 (~ 20 mM) vergleichbarer Titer nachgewiesen. Bezüglich der Säuren Acetat sowie Butyrat konnten Werte von ~ 19 mM und ~ 24 mM bestimmt werden, Produktmengen die denen des Wildtyps (~ 14 mM bzw. ~ 24 mM) ähnelten. Die während der gesamten Kulturführung für Laktat bestimmten Konzentrationen (< 1 mM) waren vergleichbar mit denen von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (< 1 mM). Für die

vergleichenden Transkriptomanalysen erfolgte eine zweite Probennahme von Zellen nach 240 h (*steady state* pH 4,5; Solventogenese).

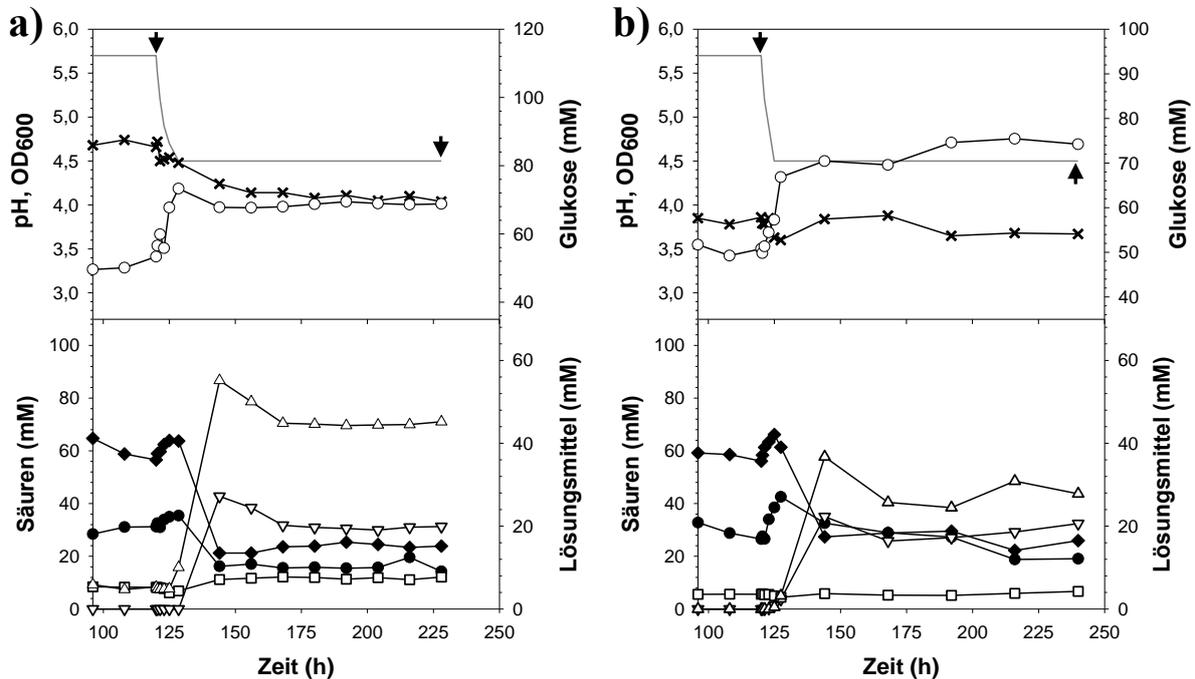


Abbildung 3.18: Fermentationsprofile von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* (b). Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten bis zum Erreichen eines *steady state* Wachstums bei pH 5,7 und pH 4,5 kultiviert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen, um Wachstum (x), pH (–) und Glukosekonzentration (o) verfolgen zu können. Die Fermentationsprodukte Acetat (●), Butyrat (◆), Aceton (▽), Ethanol (□) und Butanol (Δ) wurden mittels Gaschromatographie bestimmt wobei interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden (2.6.3). Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA Microarray Analysen. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

3.4.2 Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum adhE2::int(696)*

Für die vergleichende Genexpressionsanalyse von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der *adhE2*-Integrationsmutante wurde Gesamt-RNA aus Zellproben isoliert (2.7.2.3), die während des *steady state* Wachstums (pH 5,7; pH 4,5) und somit bei konstanten endogenen sowie exogenen Parametern entnommen wurden. Die DNA Microarrays erfolgten gemäß dem im Methodenteil beschriebenen Standardprotokoll (2.10). Die für den acidogenen (pH 5,7) und solventogenen (pH 4,5) Gärungsstoffwechsel der *adhE2*-Integrierte repräsentativen Expressionsdaten basieren auf drei biologischen Experimenten. Der Faktor 3 wurde als ein Schwellenwert für Transkriptionsänderungen verwendet, um das Expressionsverhältnis eines Gens als signifikant hochreguliert ($\geq 3,0$) oder reprimiert ($\leq -3,0$) definieren zu können (2.10.4). Die detaillierten Ergebnisse aller Gene, deren Expression signifikant auf der

Transkriptebene beeinflusst wurde, sind im Anhang (Tabelle A22, Tabelle A23, Tabelle A24, Tabelle A25) dokumentiert.

3.4.2.1 *Steady state*-Transkriptom bei pH 5,7

Während des acidogenen *steady state* Wachstums bei pH 5,7 wurden in der *adhE2*-Mutante 2 Gene (0,05 %) identifiziert, die im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 eine signifikant erhöhte Induktion aufwiesen ($\geq 3,0$). Als signifikant reprimiert ($\leq -3,0$) detektiert wurden 19 Gene (0,5 %). Die Mehrheit aller Gene (89,45 %) zeigte kein um den Faktor 3 verändertes Expressionsverhalten, 10 % der Gene wiesen kein Transkript auf oder wurden im Zuge der Auswertung der Daten des DNA Microarrays über die erforderlichen Filterkriterien (2.10.4) aussortiert.

Bei den zwei Genen mit einem in *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* signifikant verstärkten Expressionslevel handelt es sich um die Gene CAC0383 (~3,1-fach) sowie CAC0385 (~3,9-fach), die für ein „PTS cellobiose-specific component IIA“ und eine „Beta-glucosidase“ und somit für Komponenten eines der insgesamt 13 putativen Phosphotransferase-Systeme (PTS) in *Clostridium acetobutylicum* kodieren (Nölling *et al.*, 2001; Tangney & Mitchell, 2007; Yu *et al.*, 2007).

Wie zu erwarten war, gehörte das durch die Integration der Erythromycin-Resistenzkassette inaktivierte *adhE2*-Gen (CAP0035; ~-8,4-fach) zu den insgesamt 19 für die im Vergleich zum Wildtypstamm ATCC824 ein um mindestens den Faktor 3 reprimiertes Expressionsverhältnis nachgewiesen werden konnte. Zu den 18 chromosomal kodierten gehörten mit CAC0316 (*argF/T*) (~-5,1-fach), CAC0973-74 (*argG*; *argH*) (~-3,1-fach; ~-3,8-fach), CAC2388-89 (*argD*; *argB*) (~-6-fach; ~-5,7-fach) und CAC2390-91 (*argC*; *argJ*) (~-3,6-fach; ~-3,8-fach) überwiegend Gene der Argininbiosynthese. Weiterhin zeigten u.a. CAC1887 (~-3-fach) und CAC1892 (~-3,4-fach), 2 Gene die für Proteine mit hypothetischer Funktion kodieren, sowie das als „Thiamine monophosphate syntase“ annotierte Gen CAC0495 (*thiC*, ~-8,1-fach) signifikant reprimierte Transkriptmengen in der *adhE2*-Mutante bei pH 5,7.

3.4.2.2 *Steady state*-Transkriptom bei pH 4,5

Unter solventogenen *steady state* Bedingungen bei pH 4,5 konnte in der *adhE2*-Mutante für 69 Gene (1,8 %) eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Transkriptmenge ($\geq 3,0$) identifiziert werden, während 29 Gene (0,8 %) ein deutlich reprimiertes Expressionsverhältnis ($\leq -3,0$) aufwiesen. Insgesamt 89,5 % der Gene zeigten kein um den Faktor 3 verändertes

Expressionslevel, 7,9 % der Gene wiesen kein Transkript auf oder erfüllten nicht die angewandten Filterkriterien.

Sechs von den insgesamt 69 ORFs, die mindestens ein $\geq 3,0$ -fach erhöhtes Transkript gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 aufwiesen, sind vom Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997a) kodiert (Anhang, Tabelle A24). Dazu gehören eine „Cysteine protease“ (CAP0004) ($\sim 3,2$ -fach), eine „Alpha-amylase“ (CAP0168) ($\sim 3,7$ -fach), das als „Secreted protein containing cell-adhesion domains“ annotierte Gen CAP0160 ($\sim 3,4$ -fach) und mit dem Operon CAP0053-54 ($\sim 3,6$ -fach) sowie CAP0120 (~ 3 -fach) Gene des Xylanmetabolismus. Unter den chromosomal kodierten Genen befanden sich vor allem solche, die an der Synthese von organischen Schwefelmetaboliten beteiligt sind. Dabei zeigten die Gene des bereits mehrfach in diesem Zusammenhang auffällig gewordenen charakteristischen Cluster CAC0102-110 (Abbildung 3.11) eine bis zu ~ 302 -fach erhöhte Induktion im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle A24). Weiterhin offenbarten in der *adhE2*-Mutante die an Umsetzung von Sulfid zu Cystein (CAC0931, CAC2235), Cystein zu Homocystein (CAC0390-91), Homoserin zu Cystathion (CAC1825, CAC0930), O-Acetylhomoserin zu Homocystein (CAC2783) und Homocystein zu Methionin (CAC0578) beteiligten Gene (Abbildung 3.12) einen signifikanten Anstieg in der Transkriptmenge während dem solventogenen Wachstum bei pH 4,5. Mit CAC0929 (~ 25 -fach) konnte auch für das 3. Gen des putativen Operons CAC0929-31, einem als „SAM-dependent methyltransferase“ annotierten Protein, eine deutlich gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 gesteigerte Expression dokumentiert werden. Ebenso wiesen in der *adhE2*-Integrate die als „Endoglucanases“ annotierten Gene CAC0910-919 ($\sim 6,2$ -fach) und CAC3469 ($\sim 3,8$ -fach) sowie ein „Cellulase CelE like protein“ (CAC0561) ($\sim 4,4$ -fach) ein signifikant erhöhtes Expressionsverhältnis auf. Die verstärkte Transkription dieser am Abbau von Cellulose beteiligten Gene war überraschend, da einerseits Glukose während der gesamten Dauer der Fermentation die einzige Kohlenstoffquelle im Medium darstellte und nicht wachstumslimitierend war und andererseits *C. acetobutylicum* nicht in der Lage ist Cellulose abzubauen (Lee *et al.*, 1985), obgleich das Genom mehrere Gene für die Synthese eines Cellulosoms umfasst (Lopez-Contreras *et al.*, 2003; Lopez-Contreras *et al.*, 2004; Sabathe *et al.*, 2002). In *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* konnten u.a. zudem stark erhöhte Transkriptlevel für Gene identifiziert werden, die für Proteine von ABC-Transportern kodieren, wie CAC0878-80 (8,2-fach), CAC0984-86 ($\sim 35,6$ -fach) und CAC3325-27 ($\sim 17,2$ -fach), oder für Phosphotransferase-Systeme (PTS), wie CAC0383-85 ($\sim 5,8$ -fach) und CAC0386 ($\sim 5,8$ -fach).

Unter den 29 Genen, für die unter solventogenen *steady state* Bedingungen bei pH 4,5 ein im Vergleich zum Wildtyp um mindestens den Faktor 3 reprimiertes Expressionsverhältnis nachgewiesen werden konnte, befanden sich wie schon während des acidogenen Wachstums (pH 5,7) überwiegend Gene der Argininbiosynthese (Anhang, Tabelle A25). Dazu gehören CAC0316 (*argF/I*) (~-12,5-fach), CAC0973-74 (*argG*; *argH*) (~-11,5-fach), CAC2388-89 (*argD*; *argB*) (~-18,7-fach), CAC2390-91 (*argC*; *argJ*) (~-12,5-fach) und CAC3020 (*argJ*) (~-6-fach). Weiterhin konnten u. a. signifikant verringerte Transkriptmengen für Gene dokumentiert werden, die an der Biosynthese der Pyrimidine beteiligt sind (CAC2644-45) oder für Proteine mit hypothetischer Funktion kodieren (CAC1130, CAC1138, CAC3461).

3.5 Untersuchung der Pyruvat-Formiat-Lyase

Die Pyruvat-Formiat-Lyase (Pfl; EC 2.3.1.54) katalysiert die reversible, Coenzym-A (CoA) abhängige Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat. Im Rahmen der Genomsequenzierung konnten in *C. acetobutylicum* ATCC 824 zwei ORFs identifiziert werden, welche für eine putative Pyruvat-Formiat-Lyase (CAC0980) und ein zugehöriges putatives Aktivierungsenzym (CAC0981) kodieren (Nölling *et al.*, 2001). Bereits in vorangegangenen Studien konnte unter Anwendung der „Omics“-Technologien „Transcriptomics“ und „Proteomics“ gezeigt werden, dass das kodierende Gen der Pfl (*pflB*) während des Wachstums exprimiert wird (Alsaker & Papoutsakis, 2005; Janssen *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2010). Die physiologische Rolle des Enzyms ist jedoch bis dato unbekannt. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass die clostridiale Pyruvat-Formiat-Lyase über die Synthese von Formiat, dem Schlüsselintermediat für die Bildung von C₁-Körpern, eine Rolle im Anabolismus besitzt (Jungermann *et al.*, 1972; Thauer *et al.*, 1972; Weidner & Sawers, 1996; Wood & Jungermann, 1972).

Um dies genauer untersuchen zu können, galt es unter Verwendung des Clostron Systems (Heap *et al.*, 2007) Insertionsmutanten mit einem Defekt in der Pyruvat-Formiat-Lyase sowie dessen aktivierendem Enzym zu generieren.

3.5.1 Clostron-basierte Inaktivierung der Gene CAC0980 und CAC0981

Für die Inaktivierung der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*; CAC0980) sowie dessen aktivierendem Enzym (*pflA*; CAC0981) wurde das Clostron-System (Heap *et al.*, 2007) verwendet. Über die Anpassung der Erkennungssequenz des Gruppe-II-Introns an das jeweilige Zielgen mittels SOE-PCR (2.7.8.6) erfolgte die Herstellung der genspezifischen

Vektoren pMTL007C-E2-*pflB* und pMTL007C-E2-*pflA* (2.9.1). Nach einer *in vivo* Methylierung (2.8.1.2) wurden die rekombinanten Plasmide in *C. acetobutylicum* ATCC 824 elektroporiert (2.9.3). Die jeweils auf CG-Agar mit Erythromycin (10 µg/µl) gewachsenen Kolonien wurden mittels PCR-Screening (2.9.4.1) überprüft.

Die Insertion des Gruppe-II-Introns in das *pflA* Gen (CAC0981) sollte in *sense*-Orientierung nach dem 60. bp erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 36 Kolonien, aus zwei unabhängigen Elektroporationen, bezüglich einer erfolgreichen Insertion untersucht. Insgesamt 5 von ihnen konnten positiv getestet werden. Wie der Abbildung 3.19 (a) zu entnehmen ist zeigte die Gen-Gen PCR (PflA_Fwd/PflA_Rev), dass die mRNA des *pflA* Gens in *C. acetobutylicum pflA::int(60)* ein um das Gruppe-II-Intron (1849 bp) vergrößertes Fragment (2189 bp) aufwies. Für Klone, bei denen es nicht zu einer Integration kam, wurde ein 340 bp großes Fragment amplifiziert. Bei der Gen-Intron PCR wurde der PflA_Fwd und der pMTL007C-E2_Rev Primer verwendet. Letzterer bindet im Intron beim 381. bp, der Gen-spezifische Primer 60 bp vor der Insertionsregion, wodurch bei erfolgreicher Integration ein Fragment von 441 bp aufgezeigt werden konnte. Das autokatalytische Herausspleißen des Gruppe-I-Introns im Zuge des Insertionsprozesses wurde mit Hilfe der Primer ErmRAM_Fwd und ErmRAM_Rev nachgewiesen (Abbildung 3.19). In Gegenwart des gespleißten und damit integrierten RAM wurde ein Fragment von 900 bp amplifiziert, während eine Größe von 1300 bp die vollständige Länge widerspiegelte.

Nach 3 unabhängigen Transformationen konnten für das Gen CAC0980 (*pflB*) 10 von 48 durch das PCR-Screening untersuchte Kolonien als positive Integrianten detektiert werden. Klone, bei denen es zu einer Integration des Gruppe II Introns (1849 bp) nach dem 1335. bp kam, zeigten ein um dieses vergrößertes Fragment (2198 bp). Die Amplifikation eines 349 bp-Fragments spiegelte hingegen die Größe des Wildtyp-Gens wieder (Abbildung 3.19). Bei der Gen-Intron PCR (PflB_Fwd/pMTL007C-E2_Rev) bindet der Gen-spezifische Primer 185 bp vor der Insertionsregion. Das somit bei erfolgreicher Integration in *sense*-Orientierung erwartete Fragment von 566 bp konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Das autokatalytische Herausspleißen des Gruppe-I-Introns aus dem RNA-Intermediat im Zuge des Insertionsprozesses wurde, analog zum *pflA*-Gen, mit Hilfe der Primer ErmRAM_Fwd und ErmRAM_Rev aufgezeigt.

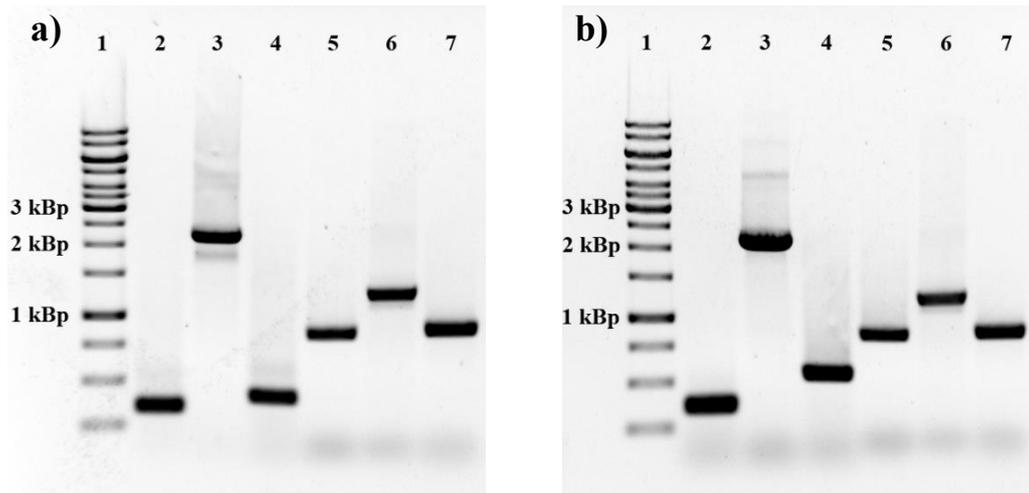


Abbildung 3.19: Verifikation der Integration in a) *C. acetobutylicum pflA::int(60)* und b) *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* mittels PCR-Screening. Spur 1: Größen- und Quantitätsmarker (Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder); Spuren 2 und 3: Gen-Gen PCR mit den spezifischen Primern PflA_Fwd/PflA_Rev bzw. PflB_Fwd/PflB_Rev und cDNA des Wildtyps (Positivkontrolle) (2) sowie der *pflA*- und *pflB*-Integrante (3); Spur 4: Gen-Intron PCR mit den Primern PflA_Fwd/pMTL007C-E2 bzw. PflB_Fwd/pMTL007C-E2 zur Verifikation der Insertion des Gruppe-II-Introns in *sense*-Orientierung; Spuren 5 und 6: Nachweis über das erfolgreiche Herauspleißen des Gruppe-I-Introns im Zuge des Insertionsprozesses unter Verwendung der Primer ErmRAM_Fwd/ErmRAM_Rev und pDNA des pMTL007C-E2 (Positivkontrolle) (5) sowie cDNA der *pflA*- bzw. *pflB*-Integrante (6) als Template.

Die endgültige Verifizierung der Mutanten erfolgte mittels Southern-Blotting (2.7.9). *In silico*-Analysen zeigten für den Nachweis der Integration im *pflA*- bzw. *pflB*-Gen Restriktionsschnittstellen des Enzyms *EcoRV* an. Zur Detektion der Fragmente wurde eine Intron-II-spezifische Sonde hergestellt (2.7.9.1) und die pDNA des pMTL007C-E2 sowie die cDNA der bereits durch PCR-Screening überprüften Mutanten *C. acetobutylicum pflA::int(60)* und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* isoliert. Nach der Hydrolyse und einer anschließenden Auftrennung der Restriktionsansätze in einem 0,8 %igen Agarosegel wurde die Southern-Hybridisierung durchgeführt. Die erwarteten Fragmentgrößen lagen bei 4487 bp für die Integrierten und 9033 bp für die Positivkontrolle, dem pMTL007C-E2 Vektor. Wie der Abbildung 3.20 zu entnehmen ist, konnten diese übereinstimmend nachgewiesen werden. Die Integration des Gruppe-II-Introns erfolgte spezifisch und ausschließlich in den gewünschten Zielgenen.

In Anbetracht der erzielten Nachweise kann davon ausgegangen werden, dass die Erzeugung einer *pflA*- sowie *pflB*-Integrations-Mutante erfolgreich war. Für die Stammhaltung (2.4) wurden Glycerinkulturen hergestellt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

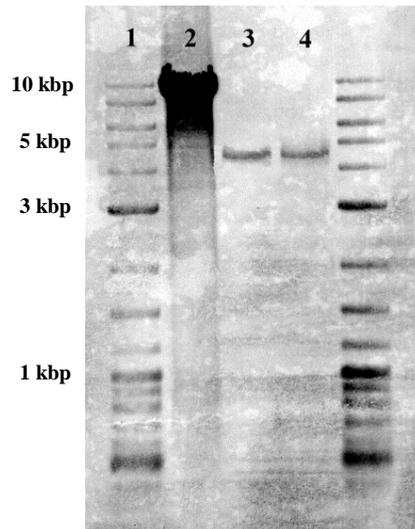


Abbildung 3.20: Verifikation der Integration in a) *C. acetobutylicum pflA::int(60)* und b) *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* mittels Southern-Hybridisierung und einer Intron-II-spezifischen Sonde. Spuren 1 und 5: Biotinylated 2-log DNA Ladder (NEB); Spur 2: pMTL007C-E2 pDNA hydrolysiert mit *EcoRV* (Positivkontrolle); Spur 3 und 4: cDNA der *pflA*- (3) sowie *pflB*-Integrante (4) hydrolysiert mit *EcoRV*.

3.5.2 Charakterisierung der Integrierten *pflA::int(60)* und *pflB::int(1335)*

Für eine erste physiologische Charakterisierung der Mutanten *C. acetobutylicum pflA::int(60)* und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* wurden Batch-Kultivierungsexperimente unter Verwendung eines Komplex- sowie Minimalmediums durchgeführt.

Ausgehend von einer auf CGM-Agar (2.3.2) mit Erythromycin (10 µg/µl) ausplattierten Glycerin-Stammkultur (2.4) erfolgte zunächst das Beimpfen von 200 ml CGM-Hauptkulturen. Wie in Abbildung 3.21 dargestellt wurde das Wachstum beider Stämme deutlich beeinträchtigt. Mit dem Erreichen der Transitionsphase zur Solventogenese konnte eine deutlich reduzierte Glukoseaufnahme nachgewiesen werden. Der pH-Verlauf der *pflA*- und *pflB*-Integrante war abweichend zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zeigte keine pH-Zunahme sondern lediglich einen Abfall auf einen Wert von je ~4,1. Die Analyse der Fermentationsprodukte im zellfreien Mediumüberstand ergab, dass Aceton und Butanol nur in geringfügigen Mengen (≤ 1 mM) produziert wurden. Weiterhin war für die Säuren Acetat und Butyrat am Ende der Kultivierung ein im Vergleich zum Wildtyp höherer Titer im zellfreien Mediumüberstand detektierbar.

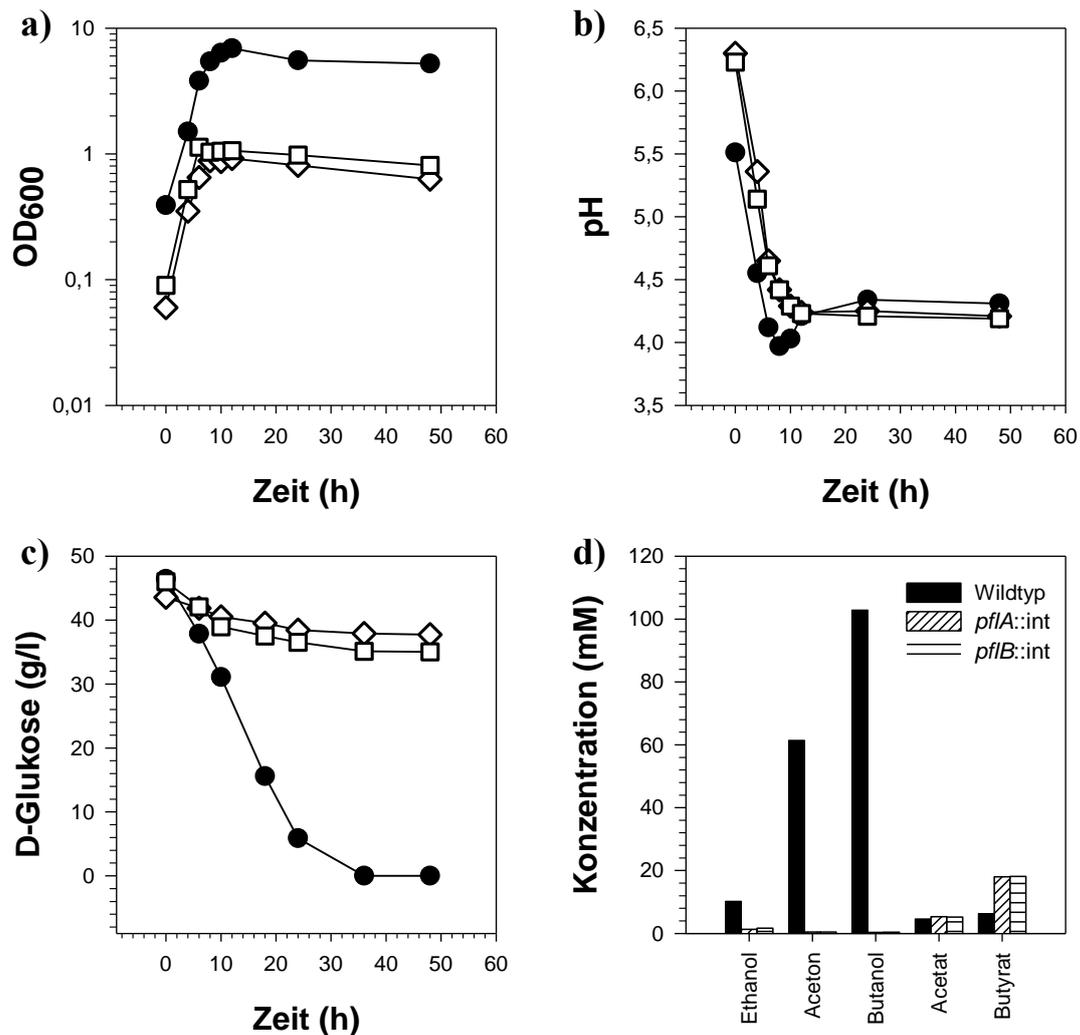


Abbildung 3.21: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (●) und *C. acetobutylicum pflA::int*(60) (◇) sowie *C. acetobutylicum pflB::int*(1335) (□) in einem Komplexmedium. Die Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 200 ml CGM und Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Dargestellt sind die Optische Dichte bei 600 nm (a), der pH-Wert (b), die bestimmte Glukosekonzentration (c) und die Fermentationsendprodukte nach einer Kultivierungsdauer von 48 h. Bei der gaschromatographischen Bestimmung der Metabolitkonzentrationen wurden interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt (2.6.3). Gezeigt ist ein repräsentatives Einzelexperiment.

Für eine Untersuchung im Minimalmedium wurde das MS-MES (2.3.2) verwendet. Um zu gewährleisten, dass die durch Überimpfen mitgeführten Komponenten des Komplexmediums CGM ausgedünnt wurden, diente eine 50 ml MS-MES Kultur als Inokulum für eine zweite MS-MES Passage, der Hauptkultur. In letzterer konnte sowohl für *C. acetobutylicum pflA::int*(60) als auch *C. acetobutylicum pflB::int*(1335) kein Wachstum mehr verzeichnet werden. Interessanterweise galt dies nicht für Kulturen, bei denen das MS-MES Medium der 2. Passage zuvor mit Hefeextrakt versehen wurde (Abbildung 3.22). Beide Stämme zeigten ein Wachstumsverhalten, das in Abhängigkeit zur zugesetzten Konzentration stand.

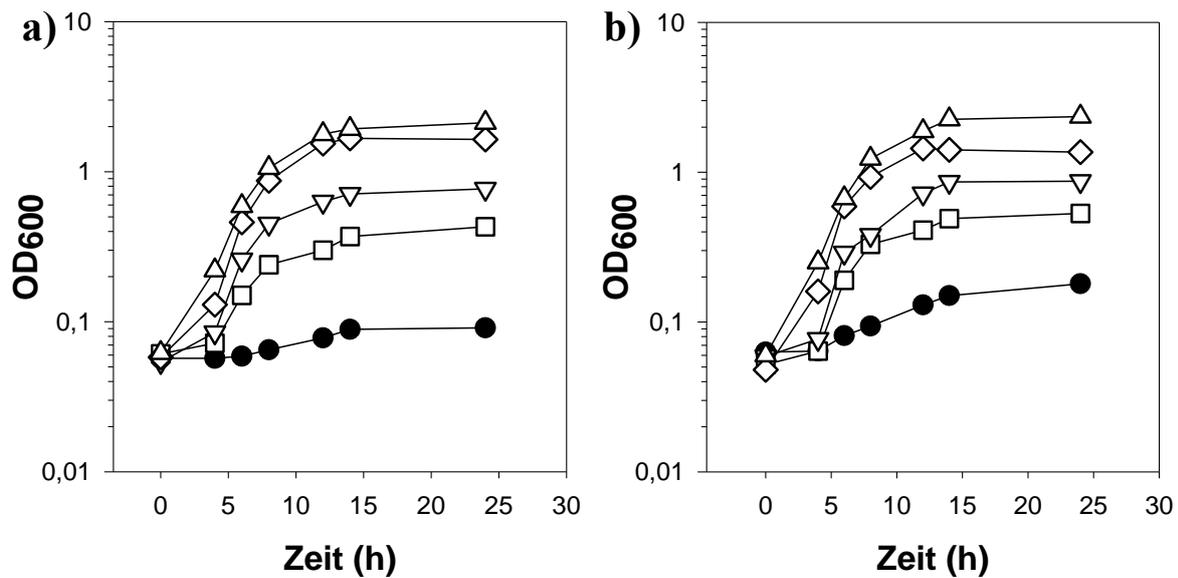


Abbildung 3.22: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum pflA::int(60)* (a) und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* (b) in einem Minimalmedium. Dargestellt ist die 2. Passage einer Batch-Fermentation in 50 ml MS-MES Medium ohne (●) und mit 0,2 g/l (□), 0,5 g/l (▽), 1 g/l (◇), 1,5 g/l (Δ) Hefeextrakt. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

Darüber hinaus konnte ca. 2 bis 3 Tage nach Anzucht von *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* in Flüssigkultur oder auf komplexem Festmedium eine auffällig gelbe Verfärbung beobachtet werden. In Abbildung A38 (Anhang) ist dies exemplarisch für eine Kultivierung auf CG-Agar (120 h) gezeigt. Es lag die Vermutung nahe, dass es zu einer verstärkten Synthese von Flavinen (lat.: *flavus* = gelb) kam. Biologisch relevante Flavine sind vor allem Riboflavin (Vitamin B₂), Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD). Über die Bestimmung des Absorptionsspektrums eines zellfreien Kulturüberstandes der *pflB*-Integrate, konnten die für Flavine 3 charakteristische Banden bei 264 nm, 373 nm und 445 nm aufgezeigt werden (Anhang, Abbildung A39).

3.5.3 Experimente zur Komplementierung der Mutationen

3.5.3.1 Formiat

In vorangegangenen Studien wurde vermutet, dass die Pyruvat-Formiat-Lyase Reaktion im Metabolismus der Clostridien für die Bildung von Formiat, dem Schlüsselintermediat zur Synthese von C₁-Körpern, benötigt wird (Jungermann *et al.*, 1968; Jungermann *et al.*, 1970; Thauer *et al.*, 1970). Vor diesem Hintergrund wurden Kultivierungen mit *C. acetobutylicum pflA::int(60)*, *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* und dem Referenzstamm ATCC 824 in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Formiat durchgeführt. Die Zellen einer gut

wachsenden CGM-Vorkultur dienten als Inokulum für eine erste Passage MS-MES. Ausgehend von dieser erfolgte das Beimpfen von 50 ml MS-MES Hauptkulturen, denen 1, 5 beziehungsweise 10 mM Formiat zugegeben wurde. Wie sich die Anwesenheit von Formiat auf das Fermentationsprofil der einzelnen Stämme auswirkte ist in Abbildung 3.23 dargestellt. *C. acetobutylicum* ATCC 824 wies mit 1 mM Formiat im Kultivierungsmedium ($0,21 \text{ h}^{-1}$) eine gegenüber der Kontrollkultur ohne Formiat ($0,22 \text{ h}^{-1}$) vergleichbare Wachstumsrate auf. Auch konnten mit $\sim 88 \text{ mM}$ Aceton, $\sim 20 \text{ mM}$ Ethanol und $\sim 111 \text{ mM}$ Butanol zur Referenz ($\sim 82 \text{ mM}$ Aceton, $\sim 24 \text{ mM}$ Ethanol und $\sim 109 \text{ mM}$ Butanol) ähnliche Endkonzentrationen im zellfreien Überstand detektiert werden (Abbildung 3.23 b). In Gegenwart von 5 mM ($0,19 \text{ h}^{-1}$) und 10 mM ($0,20 \text{ h}^{-1}$) Formiat zeigte der Wildtyp eine verlängerte Transitionsphase und wurde deutlich in der ABE-Fermentation beeinflusst. So konnten mit 10 mM Formiat nach 120 h lediglich $\sim 28 \text{ mM}$ Aceton, $\sim 7 \text{ mM}$ Ethanol und $\sim 43 \text{ mM}$ Butanol nachgewiesen werden.

Für beide Insertionsmutanten konnte in Gegenwart von Formiat, im Gegensatz zu den mitgeführten Kontrollen (0 mM), ein signifikantes Wachstum beobachtet werden (Abbildung 3.23 b). Dabei erreichten die *pflA*- und die *pflB*-Integrierte Wachstumsraten von $0,20 \text{ h}^{-1}$ und $0,15 \text{ h}^{-1}$ (1 mM), $0,20 \text{ h}^{-1}$ und $0,22 \text{ h}^{-1}$ (5 mM) sowie $0,25 \text{ h}^{-1}$ und $0,26 \text{ h}^{-1}$ (10 mM) (Anhang Tabelle A26). Die mittels Gaschromatographie (2.6.3) für *C. acetobutylicum pflA::int(60)* und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* mit 1 mM Formiat im Kultivierungsmedium bestimmten Endkonzentrationen betragen $\sim 69 \text{ mM}$ Aceton, $\sim 15 \text{ mM}$ Ethanol und $\sim 97 \text{ mM}$ Butanol bzw. $\sim 84 \text{ mM}$ Aceton, $\sim 14 \text{ mM}$ Ethanol und $\sim 116 \text{ mM}$ Butanol. Somit wiesen die beiden Knock-Out Mutanten und der Wildtyp in Gegenwart von 1 mM Formiat ein vergleichbares Produktspektrum auf. In Gegenwart von 5 mM Formiat konnte sowohl für die *pflA*- (10 %) als auch die *pflB*-Integrierte (8,1 %) eine gesteigerte Gesamtausbeute an Lösungsmitteln detektiert werden (Anhang, Tabelle A26). Höhere Konzentrationen wirkten sich eher negativ auf die ABE-Fermentation beider Knock-Out Mutanten aus (Anhang, Tabelle A26). Interessanterweise konnte für die *pflB*-Insertionsmutante auch in den Experimenten mit Formiat eine zunehmend sichtbare gelbe Verfärbung des Mediums beobachtet werden, deren Ursache vermutlich auf die Akkumulation von Flavinen zurückzuführen war. Da die Annahme bestand, dass es sich um Riboflavin handelt, erfolgte eine entsprechende Konzentrationsbestimmung der zellfreien Kulturüberstände gemäß der unter 2.6.6 beschriebenen Methode.

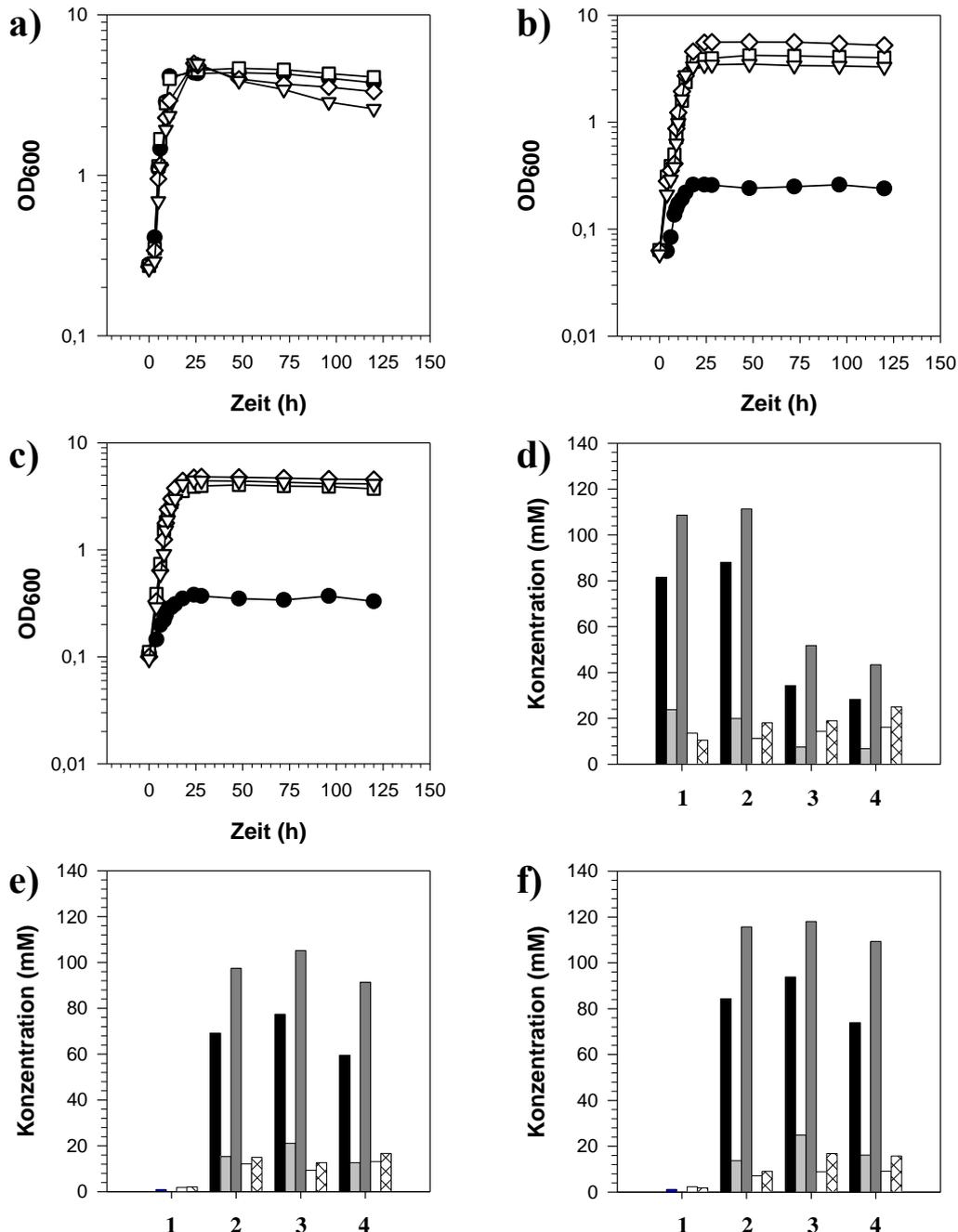


Abbildung 3.23: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und der Knock-Out Mutanten *C. acetobutylicum pflA::int(60)* (b) sowie *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* (c) in Gegenwart von Formiat. Dargestellt ist die 2. Passage einer Batch-Fermentation in 50 ml MS-MES Medium. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurden den Kulturen unterschiedliche Konzentrationen an Formiat zugesetzt. Die nach 120 h für den Wildtyp, die *pflA*- und *pflB*-Integrierte bestimmten Konzentrationen der Fermentationsprodukte Aceton (schwarz), Ethanol (grau), Butanol (dunkelgrau), Acetat (weiß) und Butyrat (weiß, Muster) sind in **d**), **e**) bzw. **f**) dargestellt. ●, 1: 0 mM Formiat; □, 2: 1 mM Formiat; ◇, 3: 5 mM Formiat; ▽, 4: 10 mM Formiat. Bei der gaschromatographischen Bestimmung der Metabolitkonzentrationen wurden interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt (2.6.3). Gezeigt ist ein repräsentatives Einzelexperiment.

Nach einer Kultivierung von 120 h konnten bis zu $\sim 93 \mu\text{M}$ im Medium von *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* detektiert werden (Anhang, Tabelle A26). Für

C. acetobutylicum *pflA::int(60)* waren nur sehr geringe Konzentrationen ($\leq 1 \mu\text{M}$) nachweisbar.

3.5.3.2 Nukleotide

Im Zuge der Purinbiosynthese werden ausgehend von 1 mol 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) unter Verbrauch von 2 mol Glutamin, 1 mol Glycin, 1 mol Aspartat und 2 mol 10-Formyltetrahydrofolat 1 mol Inosinmonophosphat (IMP) gebildet, dem zentralen Intermediat zur Bildung von Adenosin- (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP). Durch die Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* konnte ein Gen (CAC3201) identifiziert werden, dass für eine Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase [EC:6.3.4.3] kodiert (Nölling *et al.*, 2001). Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Umsetzung von Formiat und Tetrahydrofolat zu 10-Formyltetrahydrofolat. Es stellte sich somit die Frage, ob das durch die Pyruvat-Formiat-Lyase Reaktion produzierte Formiat im Metabolismus der Clostridien für den Aufbau des Purinrings benötigt wird. Im Rahmen weiterer Batch-Fermentationen sollte daher überprüft werden inwiefern das Wachstum der *pflA*- und *pflB*-Integrate durch die Zufuhr von Nukleotiden zum Kultivierungsmedium beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurden in CGM angezogenen Vorkulturen in MS-MES überimpft, die anschließend als Inokulum für die mit 50 ml des Minimalmediums gefüllten Hauptkulturen dienten. Die entsprechenden Medienzusätze wurden unmittelbar vor dem Beimpfen der 2. MS-MES Passage beigefügt. Für eine Kontrolle erfolgte eine parallele Kultivierung der Knock-Out Mutanten in Gegenwart von 1 mM Formiat.

In einem ersten Ansatz wurden 200 $\mu\text{g/ml}$ einer aus Lachssperma gewonnenen hochmolekularen DNA verwendet. Jedoch weder für die zuvor durch eine DNase verdaute noch für die unverdaute Form der Lachs-DNA konnte ein positiver Effekt beobachtet werden. Auch hochreine Nukleotide in Form eines handelsüblichen dNTP-Sets brachten keine Veränderungen bezüglich des Wachstums mit sich. Ein weiterer Versuch beinhaltete die Verwendung phosphatfreier Nukleoside. Wie der Abbildung 3.24 entnommen werden kann, wurden die Knock-Out Mutanten in Anwesenheit von Gemischen aus Purin- bzw. Pyrimidinbasen kultiviert. Erwartungsgemäß war für die Kulturen ohne Medienzusätze kein Wachstum in der 2. Passage MS-MES zu beobachten. In Gegenwart von Adenosin und Guanosin wiesen beide Stämme zu Beginn eine deutlich verlängerte lag-Phase im Vergleich zu den mit 1 mM Formiat versetzten Kontrollkulturen auf, erreichten jedoch im weiteren Verlauf eine ähnliche maximale OD_{600} von 4,3 - 5,2.

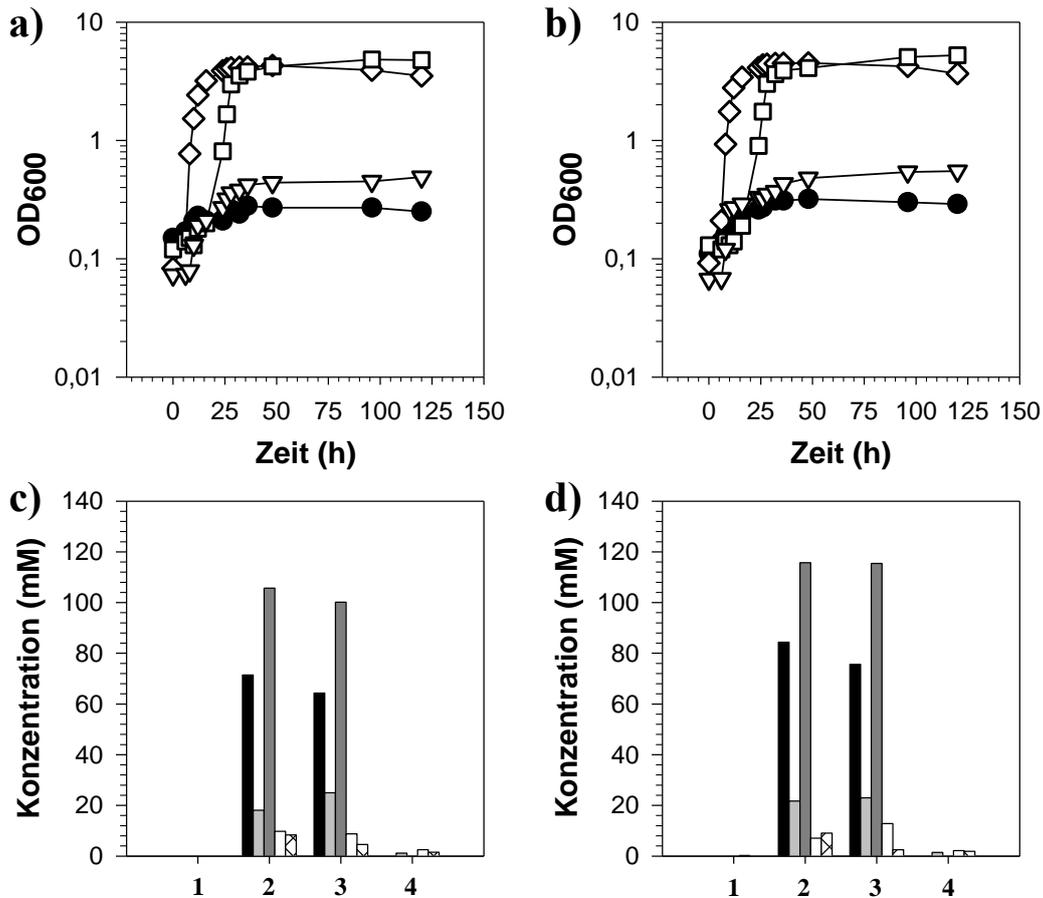


Abbildung 3.24: Batch-Fermentationen der Knock-Out Mutanten *C. acetobutylicum pflA::int(60)* (a) und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* (b) in Gegenwart von Nukleosiden. Dargestellt ist das Wachstum in 50 ml einer 2. Passage MS-MES, die vor dem Beimpfen mit unterschiedlichen Medienzusätzen versehen wurde. Die nach 120 h für die *pflA*- und *pflB*-Integrante bestimmten Konzentrationen der Fermentationsprodukte Aceton (schwarz), Ethanol (grau), Butanol (dunkelgrau), Acetat (weiß) und Butyrat (weiß, Muster) sind in c) bzw. d) dargestellt. ●, 1: ohne Zusätze; ◇, 2: 1 mM Formiat; □, 3: 1 mM Adenosin + 1 mM Guanosin; ▽, 4: 1 mM Cytosin + 1 mM Thymidin + 1 mM Uridin. Bei der gaschromatographischen Bestimmung der Metabolitkonzentrationen wurden interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt (2.6.3). Gezeigt ist ein repräsentatives Einzelexperiment.

Die für *C. acetobutylicum pflA::int(60)* (~64 mM Aceton, ~25 mM Ethanol und ~101 mM Butanol) und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* (~76 mM Aceton, ~23 mM Ethanol und ~115 mM) bestimmten Konzentrationen der Fermentationsendprodukte waren mit denen der mitgeführten Kontrollen vergleichbar (Anhang, Tabelle A27). Durch die Zugabe von 1 mM des jeweiligen Purinnukleosids konnte eine Komplementierung des Knock-Outs in der Pyruvat-Formiat-Lyase sowie dessen aktivierendem Enzym erzielt werden. Wie bereits für die Kultivierungsexperimente mit Formiat beschrieben (3.5.3.1), kam es jedoch auch hier bei der *pflB*-Integrante zu einer, vermutlich durch die Akkumulation von Riboflavin hervorgerufenen, stark gelben Verfärbung des sonst farblosen MS-MES Mediums. Über eine entsprechende Konzentrationsbestimmung konnte für *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* eine Produktion von

bis zu ~119 μM Riboflavin nachgewiesen werden. Die mit einem Gemisch aus je 1 mM Cytidin, Thymidin und Uridin versetzten Kulturen erreichten eine maximale OD_{600} von 0,49 - 0,55. Im zellfreien Mediumüberstand beider Insertionsmutanten waren nach 120 h lediglich sehr geringfügige Mengen an Acetat, Butyrat und Ethanol nachweisbar (Anhang, Tabelle A27). Somit konnte mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente gezeigt werden, dass durch die Pfl synthetisiertes Formiat in *C. acetobutylicum* ATCC 824 als Überträger von Formylgruppen während der Bildung der Purinnukleotide fungiert.

3.5.4 Transkriptomanalyse

Durch die Mutation in der Pyruvat-Formiat-Lyase hervorgerufene Veränderungen in der Genexpression sollten mit Hilfe von DNA Microarray Analysen (2.10) identifiziert werden. Daher erfolgte eine Kultivierung von *C. acetobutylicum* ATCC824 und der Insertionsmutante *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* in 250 ml CG-Medium (2.3.2) mit 1 mM Formiat. Zellproben für eine Isolierung der Gesamt-RNA (2.7.2.3) wurden während der exponentiellen sowie stationären Wachstumsphase entnommen (Anhang, Abbildung A40). Nach der Markierung der cDNA (2.9.1) erfolgte die Hybridisierung mit den „probes“ auf der Oberfläche des DNA Microarrays (2.10.2). Die Expressionsdaten basieren auf einem biologischen Experiment und vier Hybridisierungsreaktionen (jeweils 2 Microarray Experimente mit gegenläufiger Cy3-/Cy5-Farbstoffmarkierung). Wie im Methodenteil beschrieben (2.10.4) wurde der Faktor 3 als Schwellenwert für Transkriptionsänderungen verwendet, um das Expressionsverhältnis eines Gens definieren zu können. Der vollständige DNA Microarray-Datensatz, kann bei der Array Express-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) unter Verwendung der Zugangsnummer E-MTAB-2059 über die aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikation eingesehen werden.

3.5.4.1 Signifikant auf der Transkriptebene beeinflusste Gene während der exponentiellen Wachstumsphase

Insgesamt wurden in Zellen der exponentiellen Wachstumsphase 82 Gene identifiziert, die eine im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 signifikant auf der Transkriptebene beeinflusste Expression aufwiesen. Dabei konnte für 64 Gene (1,7 %) eine signifikant erhöhte Induktion ($\geq 3,0$) detektiert werden, 18 Gene (0,5 %) wiesen eine deutlich verringerte Transkription ($\leq -3,0$) auf. Die Mehrheit der Gene (76,6 %) offenbarte kein um mindestens den Faktor 3 verändertes Expressionslevel, 21,2 % der Gene zeigten kein Transkript oder

wurden im Zuge der Auswertung der Daten des DNA Microarrays über die erforderlichen Filterkriterien (2.10.4) aussortiert.

Bereits während des exponentiellen Wachstums wurden in der *pflB*-Integrate mit CAC0590 (~3,2-fach), CAC0592 (~3,1-fach) und CAC0593 (~3-fach) Gene signifikant auf der Transkriptebene beeinflusst, deren Produkte für die Bildung von Riboflavin verantwortlich sind. Für CAC0591, ebenfalls Bestandteil des *ribDBAH*-Operons (CAC0590-93), wurde ein Expressionslevel detektiert, welches nur knapp unter dem Schwellenwert für eine signifikante Genexpression lag. Weiterhin zeigten während des exponentiellen Wachstums CAC0495 (~7,8-fach), CAC1356 (~8,1-fach), das *thiSFGHE*-Operon (~3,6-fach) und CAC3014 (~-3,1-fach), Gene die für Enzyme der Biosynthese von Thiamin kodieren, eine gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöhte Transkription. Darüber hinaus wiesen in der *pflB*-Mutante Gene eine deutlich erhöhte Transkriptmenge auf, die in Verbindung mit dem Transport von Cobalt, CAC1367-69 (~3,4-fach), und der Biosynthese von Cobalamin, CAC1372 (~3,6-fach) und CAC1377 (~3,2-fach), sowie Biotin, CAC0210-11 (~3,3-fach) und CAC1360-61 (~4,2-fach), stehen. In *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* konnten zudem erhöhte Expressionslevel für Gene identifiziert werden, die für Proteine von ABC-Transportern, CAP0073 (~16,7-fach) und CAC3641-44 (~4,9-fach), oder für Phosphotransferase-Systeme (PTS), CAC0383-85 (~18,1-fach) und CAC0386 (~17,3-fach), kodieren. Zusätzlich zeigten noch 14 offene Leserahmen ein erhöhtes Transkript (~3,1 bis 26,1-fach), die als Proteine mit hypothetischer Funktion annotiert sind.

Unter den insgesamt 18 Genen, die in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 während der exponentiellen Wachstumsphase ein signifikant reprimiertes Transkriptlevel ($\leq -3,0$) aufwiesen, befanden sich u. a. CAP0067 (~-158,7-fach) und CAP0068 (~-48,6-fach), die Teil des putativen Operons für das Mannose/Fruktose-PTS (CAP0066-68) sind, und die des putativen *ilv-leu* Operons (CAC3169-3174) (~-4-fach), deren Genprodukte in den Stoffwechsel der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin involviert sind.

Für das als „*formate:tetrahydrofolate ligase*“ annotierte Gen CAC3201 konnte während des exponentiellen Wachstums in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* kein signifikanter Einfluss auf der Transkriptebene detektiert werden.

3.5.4.2 Signifikant auf der Transkriptionsebene beeinflusste Gene während der stationären Wachstumsphase

Die vergleichende Transkriptionsanalyse ergab, dass in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* während der solventogenen Wachstumsphase 26 vom Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997a) kodierte Gene eine $\geq 3,0$ -fach erhöhte Expression im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Darunter sind u.a. das paraloge Gen der Thiolase (*thlB*, CAP0078) (~367,4-fach) sowie des putativen Repressors (*thlR*, CAP0079) (~79,3-fach), die zusammen mit einem für ein nicht charakterisiertes Eisen-Schwefel Protein kodierendes Gen (*thlC*, CAP0077) (Winzer *et al.*, 2000) ein tricistronisches Operon bilden, die des *sol* Operons (CAP0162-64) (~8,3-fach), der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*, CAP0165) (~6,6-fach) und der NADH-abhängigen Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2 (*adhE2*, CAP0035) (~71,9-fach). Ein in der *pflB*-Integrierte signifikant gesteigertes Expressionsverhältnis konnte auch für das als „Uncharacterized gene product with unknown function“ annotierte Gen CAP0037 (~3,4-fach), „Transcriptional regulators“ (CAP0087, CAP100, CAP108, CAP0178) und ein Operon für Xylanasen (CAP0053-54) (~11,7-fach) detektiert werden.

Unter den chromosomal kodierten Genen, für die ein gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 signifikant gesteigertes Transkriptlevel bestimmt werden konnte, befanden sich u. a. das für eine L-Laktat-Dehydrogenase kodierende Gen CAC0267 (~50,1-fach), das primäre Thiolase-Gen *thlA* (CAC2873) (~3,3-fach) und CAC2712 (~3,6-fach), ein Gen des sogenannten *BCS*-Operons (Butyryl-CoA synthesis; (Cornillot *et al.*, 1997a)). Weiterhin zeigten in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* Gene, die in die Stressantwort der Zelle involviert sind, ein gesteigertes Transkriptionsprofil während der stationären Wachstumsphase. Dazu gehören z.B. das Operon *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* (CAC1280-83) (~16,5-fach) (Narberhaus *et al.*, 1992), das Operon *groEL-groES* (CAC2703-04) (~20,1-fach) (Narberhaus & Bahl, 1992), das Operon *clpC-yacI-yacH-ctsR* (CAC3189-92) (~20,6-fach), *htpG* (CAC3315) (~13,8-fach) und *hsp18* (CAC3714) (~126,8-fach) (Sauer & Dürre, 1993). Eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Transkriptmenge konnte auch für das Rubredoxin (CAC2778) (~9,1-fach) gemessen werden, einem intermediären Elektronenüberträger dem eine Funktion im anaeroben Detoxifikationssystem für O₂ und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zugeschrieben wurde (Hillmann *et al.*, 2009). Ebenso wiesen mit CAC2645 (~4,6-fach) und dem putativen Operon CAC2650-54 (~6,5-fach) Gene der Pyrimidinbiosynthese ein signifikant induziertes mRNA-Level in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* während der stationären Wachstumsphase auf. Für die Gene der Purinbiosynthese konnten hingegen keine Veränderungen im Expressionslevel beobachtet werden. Wie die Analyse der Microarray-

Datensätze ergab, wurde in der *pflB*-Integrante die Transkription des putativen *feo* Operons (CAC1029-31) (~8,2-fach), bestehend aus zwei orthologen FeoA-Proteinen und einer FeoB-ähnlichen GTPase, signifikant erhöht. Ursprünglich in *E. coli* durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass das *feo*-System der anaeroben Aufnahme von Eisen dient (Kammler *et al.*, 1993). Es wird vermutet, dass das Operon in *C. acetobutylicum* einen entscheidenden Faktor für den Eisen-Gehalt der Zelle darstellt (Alsaker & Papoutsakis, 2005). Weiterhin zeigten CAC0075 (~6,6-fach) und CAC3527 (~4-fach) ein signifikant im Vergleich zum Wildtyp gesteigertes Expressionsverhalten. Dabei handelt es sich um zwei der insgesamt fünf in *C. acetobutylicum* annotierten ORFs, die für putative Ferredoxine kodieren (Nölling *et al.*, 2001). Auch konnte während der stationären Wachstumsphase eine deutliche erhöhte Expression der ORFs CAC0587 (~13,1-fach) und CAC3417 (~60,2-fach) bestimmt werden, Gene die für „Flavodoxine“ kodieren. Stark induziert in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* waren auch die Transkription der als „Thioredoxin“ (CAC1547) (~4,7-fach), „Glutathione peroxidase“ (CAC1549, CAC1570-71) (~5,6- bis ~7,8-fach), „Glutaredoxin“ (CAC2777) (~5-fach) und „Thiol peroxidase“ (CAC3306) (~3,2-fach) annotierten Gene dessen Proteine Thiolgruppen tragen und eine Funktion im zellulären Redoxhaushalt einnehmen. Mit CAC0590-93 (~5,6-fach) zeigten in der *pflB*-Mutante alle Gene des an der Riboflavinbiosynthese beteiligten *ribDBAH*-Operons ein signifikant erhöhtes Expressionslevel.

Ein im Vergleich zum Wildtyp um mindestens den Faktor 3 ($\leq -3,0$) reprimiertes Expressionsverhältnis konnte u.a. für zahlreiche Gene nachgewiesen werden, die im Zusammenhang mit dem Schwefelmetabolismus in *C. acetobutylicum* stehen (Abbildung 3.12). Dazu zählen der Gen-Cluster CAC0102-110 (~90,5-fach) (3.5.4), CAC0390-91 (~53,5-fach), CAC0578 (~12,5-fach), CAC0930 (~39,7-fach), CAC1825 (~13-fach), CAC2235 (~41,9-fach) und CAC2783 (~14,1-fach). Ebenfalls in der *pflB*-Mutante während des stationären Wachstums signifikant auf der Transkriptionsebene verringert war die Transkription der Gene des *aro*-Operons (CAC0892-99) (~13-fach), einer putativen Alkohol-Dehydrogenase (CAP0059) (~3,6-fach), der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (CAC2229) (~4,3-fach), einem Gen-Cluster der Flagellensynthese (CAC2147-69) (~3,3- bis ~12,2-fach) und der Gene CAC2866-71 (~4,4-fach), die für Untereinheiten der ATP-Synthase kodieren. Weiterhin konnte ein gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 deutlich reprimiertes Expressionsprofil für Gene identifiziert werden, die eine Funktion in der Fettsäuresynthese einnehmen. Dazu gehören Gene des sogenannten *fab*-Operons (CAC3568-79) (Alsaker *et al.*, 2010), CAC3568 (~3,3-fach) und CAC3570-78 (~4,1-fach), sowie die

ORFs CAC2000-25 (~18,1-fach). Letztere sind Teil eines insgesamt 47 Gene umfassenden Clusters (CAC1980-2026) (Grimmler *et al.*, 2011; Schwarz *et al.*, 2012). Ein in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* stark im Vergleich zum Wildtyp verringertes Transkriptlevel konnte zudem, wie schon während der exponentiellen Wachstumsphase, für die Gene des putativen *ilv-leu* Operons (CAC3169-3174) (~77,2-fach) dokumentiert werden. Auffällig war auch die signifikant reprimierte Expression eines Gen-Clusters (CAC3097-3151) (~7,3-fach) der überwiegend für ribosomale Proteine kodiert, was darauf hinweist, dass die zelluläre Proteinbiosynthese durch die Mutation in der Pfl deutlich beeinflusst wurde.

Für das als „formate:tetrahydrofolate ligase“ annotierte Gen CAC3201 konnte auch während des stationären Wachstums in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* kein signifikanter Einfluss auf das Expressionsverhältnis im Vergleich zum Wildtyp bestimmt werden.

3.5.5 Verifizierung ausgewählter Daten der Transkriptionsanalysen durch *real-time* RT-PCR

Für ausgewählte Gene wurden die Ergebnisse, die mit den DNA-Microarray Experimenten gewonnen wurden, durch *real-time* RT-PCR als zweite Methode verifiziert (Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13: Vergleich der durch DNA-Microarrays und *real-time* RT-PCR ermittelten Expressionsverhältnisse ausgewählter Gene. Werte größer $\geq 3,0$ stellen eine im Vergleich zum Wildtyp (WT) signifikant erhöhte Expression in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* (*pflB*) dar. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Die Expressionsdaten basieren auf je einem biologischen Experiment.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Expressionsverhältnis	
			WT vs. <i>pflB</i>	
			DNA Microarray	<i>real-time</i> RT-PCR
CAC0590	<i>ribD</i>	Riboflavin biosynthesis protein RIBD (pyrimidine deaminase and pyrimidine reductase)	7,21	7,95
CAC0591	<i>ribB</i>	riboflavin synthase subunit alpha	5,80	6,14
CAC0592	<i>ribA</i>	Riboflavin biosynthesis protein RIBA (GTPcyclohydrolase/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase)	5,36	4,87
CAC0593	<i>ribH</i>	riboflavin synthase subunit beta	3,88	4,53

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Die für diese Analysen verwendete RNA stammte aus der stationären Wachstumsphase der Kultivierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* in 250

ml CGM (2.3.2) mit 1 mM Formiat (Anhang, Abbildung A40). Verglichen werden sollte die Expression der im *ribDBAH*-Operon (CAC0590-93) organisierten Gene. Als endogene Kontrolle diente in dieser Arbeit die Butyrat-Kinase (CAC3075), deren Expression unter den untersuchten Bedingungen konstant sein sollte. Die Quantifizierung bei der *real-time* RT-PCR erfolgte über den C_t -Wert (cycle threshold). Anschließend wurden die Expressionsverhältnisse, wie im Methodenteil beschrieben (2.7.8.5), berechnet. Die *real-time* RT-Experimente bestätigten die Ergebnisse aus den DNA Microarrays. So konnte verifiziert werden, dass die in an der Riboflavinbiosynthese beteiligten Gene CAC0590-93 in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* während des stationären Wachstums eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Transkription aufweisen.

3.6 Untersuchung der Pyruvat-Decarboxylase

Die Pyruvat-Decarboxylase (Pdc; EC 4.1.1.1) katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu CO_2 und Acetaldehyd. Letzteres wird durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase und/oder Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2) zu Ethanol reduziert. BLAST-Analysen ergaben, dass *C. acetobutylicum* der einzige Vertreter der Gattung *Clostridia* ist, der über eine Pdc verfügt (Grimmer *et al.*, 2011). Weiterhin konnten Grimmer *et al.* zeigen, dass das auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisierte Gen der Pyruvat-Decarboxylase (CAP0025, *pdc*) lediglich während des Transition vom acidogenen zum solventogenen Metabolismus induziert war. Somit scheint dieses Enzym eine wichtige Aufgabe im Wechsel des fermentativen Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* ATCC 824 einzunehmen. Vor dem Hintergrund, dass relativ wenig bekannt ist über die molekularen Ereignisse, die mit dem metabolischen „shift“ zur Lösungsmittelbildung einhergehen, erfolgte die Konstruktion von *C. acetobutylicum pdc::int(843)* (Abbildung 3.25).

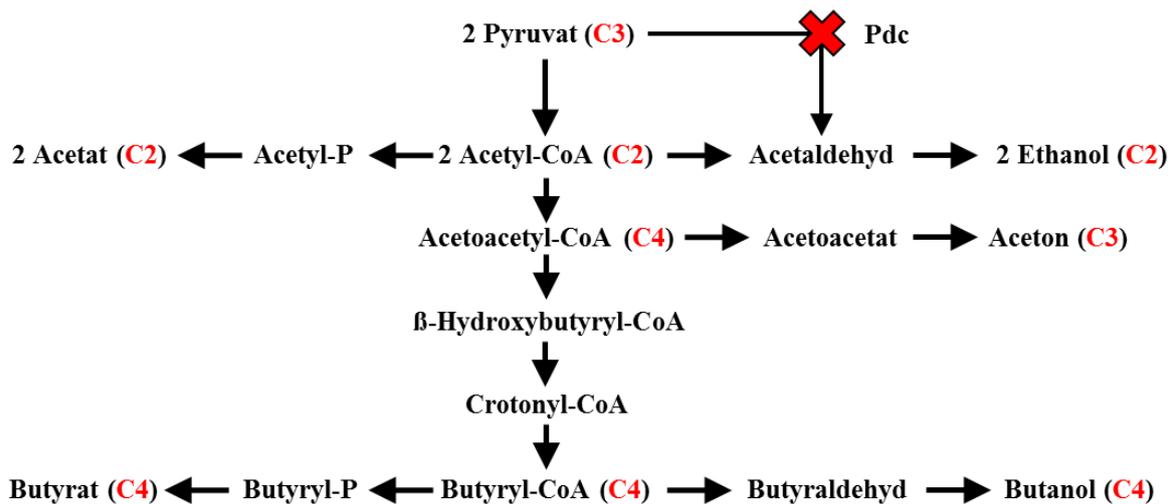


Abbildung 3.25: Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* ATCC 824. In rot dargestellt sind die den Fermentationsprodukten entsprechenden C-Körper. Die Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) ist in *C. acetobutylicum* *pdc::int(843)* inaktiviert (rotes Kreuz).

3.6.1 Konstruktion einer *C. acetobutylicum* *pdc::int(843)* Integrierte

Die Inaktivierung des für die Pyruvat-Decarboxylase kodierenden Gens CAP0025 (*pdc*) erfolgte analog zur Erzeugung der *pflA*- und *pflB*-Integrierte (3.5.1). Nach der Elektroporation des rekombinanten Plasmids in *C. acetobutylicum* ATCC 824 (2.9.3) wurden auf CG-Agar mit Erythromycin (10 µg/µl) gewachsene Kolonien mittels PCR-Screening (2.9.4.1) unter Ausnutzung spezifischer Primer überprüft. Die Insertion des Gruppe-II-Introns in das *pdc* Gen sollte in *sense*-Orientierung nach dem 843. bp erfolgen. Durch das Screening konnten aus einer Elektroporation 7 von 16 untersuchten Erythromycin-resistenten Kolonien als positive Integrierte detektiert werden. Diese wurden nachfolgend als *C. acetobutylicum* *pdc::int(843)* bezeichnet. Wie der Abbildung 3.26 zu entnehmen ist zeigte die Gen-Gen PCR (Pdc_Fwd/Pdc_Rev), dass die mRNA des *pdc* Gens in *C. acetobutylicum* *pdc::int(843)* ein um das Gruppe-II-Intron (1849 bp) vergrößertes Fragment (2253 bp) aufwies. Für Klone, bei denen es nicht zu einer Integration kam, wurde ein 404 bp großes Fragment amplifiziert. Bei der Gen-Intron PCR wurde der Pdc_Fwd und der pMTL007C-E2_Rev Primer verwendet. Letzterer bindet im Intron beim 381. bp, der Gen-spezifische Primer 265 bp vor der Insertionsregion, wodurch bei erfolgreicher Integration ein Fragment von 646 bp aufgezeigt werden konnte. Das autokatalytische Herausspleißen des Gruppe-I-Introns im Zuge des Insertionsprozesses wurde mit Hilfe der Primer ErmRAM_Fwd und ErmRAM_Rev nachgewiesen. In Gegenwart des gespleißten und damit integrierten RAM wurde ein Fragment von 900 bp amplifiziert, während eine Größe von 1300 bp die vollständige Länge widerspiegelte.

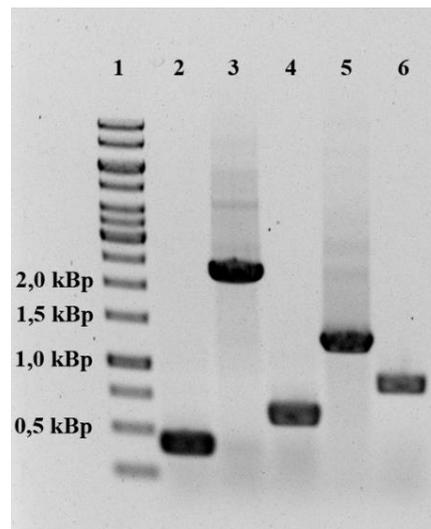


Abbildung 3.26: Verifikation der Integration in *C. acetobutylicum pdc::int(843)* mittels PCR-Screening. Spur 1: Größen- und Quantitätsmarker (Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder); Mit den beiden Gen-spezifischen Primern Pdc_Fwd/Pdc_Rev konnte ein DNA Fragment mit einer Größe von 404 bp für den Wildtyp (Spur 2) sowie ein um das Gruppe-II-Intron vergrößertes PCR Produkt von 2253 bp für *C. acetobutylicum pdc::int(843)* (Spur 3) amplifiziert werden. In einer Gen-Intron PCR mit den Primern Pdc_Fwd und pMTL007C-E2 wurde die erfolgreiche Insertion in *sense*-Orientierung verifiziert (Spur 4). Unter Verwendung der Primer ErmRAM_Fwd/ErmRAM_Rev konnte in einer Positivkontrolle mit pDNA des pMTL007C-E2 als Template der, durch das Gruppe-II-Intron unterbrochene, RAM (1300 bp) aufgezeigt werden (Spur 5). Durch ein 900 bp großes Fragment wurde die gespleißte und folglich integrierte RAM-Kassette wiedergespiegelt (Spur 6).

Die abschließende Bestätigung der Mutante erfolgte durch Southern-Hybridisierung. *In silico*-Analysen zeigten für den Nachweis der Integration im *pdc*-Gen Restriktionsschnittstellen des Enzyms *EcoRV* auf. Die DNA von pMTL007C-E2 sowie die cDNA der bereits durch PCR-Screening überprüften Mutante *C. acetobutylicum pdc::int(843)* wurden isoliert, mit *EcoRV* hydrolysiert und die DNA-Hybridisierung wie unter 2.7.9 beschrieben durchgeführt. Zur Detektion der Fragmente wurde mittels PCR und den entsprechenden Oligonukleotiden eine Intron-II-spezifische Sonde hergestellt (2.7.9.1). Die erwarteten Fragmentgrößen lagen bei 8665 bp für die Integrante und 9033 bp für die Positivkontrolle, dem pMTL007C-E2 Vektor. Wie der Abbildung 3.27 zu entnehmen ist, konnten diese übereinstimmend nachgewiesen werden. Die Integration des Gruppe-II-Introns erfolgte spezifisch und ausschließlich im gewünschten Zielgen.

Für die Stammhaltung (2.4) wurden Glycerinkulturen hergestellt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

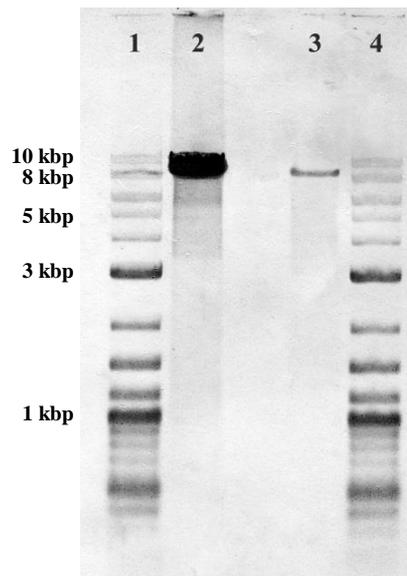


Abbildung 3.27: Verifikation der Integration in *C. acetobutylicum* *pdc::int(843)* mittels Southern-Hybridisierung und einer Intron-II-spezifischen Sonde. Spuren 1 und 4: Biotinylated 2-log DNA Ladder (NEB); Spur 2: pMTL007C-E2 pDNA hydrolysiert mit *EcoRV* (Positivkontrolle); Spur 3: cDNA der *pdc*-Integrante hydrolysiert mit *EcoRV*.

3.6.2 Charakterisierung der Pyruvat-Decarboxylase-Integrationsmutante

Die physiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum pdc::int(843)* erfolgte in einem Chemostaten mit einem Kulturvolumen von 0,75 l unter Phosphatlimitierung (2.3.2). Das Beimpfen des Fermenters erfolgte wie im Methodenteil beschrieben (2.5.4.2). Nach dem Anschalten der Zufuhr des Vorratsmediums, was einhergeht mit dem Beginn der kontinuierlichen Kulturführung ($t = 0$ h), wurde die Kultur nur noch durch den externen Parameter pH, kontrolliert.

Die Abbildung 3.28 zeigt, neben *C. acetobutylicum* ATCC 824 als Referenz (a), das Fermentationsprofil von *C. acetobutylicum pdc::int(843)* (b). Dargestellt ist der Wechsel zwischen dem acidogenen (pH 5,7) und dem solventogenem Wachstum (pH 4,5). Nach etwa 3 Tagen ($t = 65-80$ h) erreichte die *pdc*-Integrante ein acidogenes *steady state* Wachstum bei pH 5,7. Die Kultur wies eine konstante Zelldichte von $OD_{600} = \sim 4,0$ und stabile Produktkonzentrationen von ~ 35 mM Acetat und ~ 54 mM Butyrat auf, die vergleichbar mit denen des Wildtyps (~ 31 mM Acetat, ~ 57 mM Butyrat) waren. Nach 108 h, und somit mehr als 24 h im *steady state* Wachstum, erfolgte die erste Probennahme für die DNA Microarray Analysen (2.10) (*steady state* pH 5,7; Acidogenese). Unmittelbar danach wurde durch das vorübergehende Abschalten der pH-Kontrolle der „shift“ vom säure- zum lösungsmittelbildenden Metabolismus eingeleitet. Innerhalb von etwa 7,5 h, einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Zeit ($\sim 8,5$ h), sank der externe pH-Wert allein durch die Ansäuerung

des Mediums von pH 5,7 auf pH 4,5. Solventogenes *steady state* Wachstum bei pH 4,5 wurde ca. 48 h ($OD_{600} = \sim 3,97$) nach dem wieder Einschalten der pH-Kontrolle erreicht. Die Glukosekonzentration der *pdc*-Mutante stieg auf ~ 85 mM und pendelte sich auf ~ 70 mM und war somit vergleichbar mit der des Wildtyps (~ 69 mM). Im Zuge der Induktion der Lösungsmittelproduktion konnte für *C. acetobutylicum pdc::int(843)* zunächst ein Anstieg der Butanolkonzentration bis auf ~ 34 mM beobachtet werden. Im Gegensatz zum Wildtyp kam es jedoch dann zu einem markanten Einbruch dieses Gärungsprodukts (~ 17 mM), was den auffälligen Anstieg in der Glukosekonzentration erklären könnte. Wie aus der Abbildung 3.28 hervorgeht, wurden 252 h nach Start der kontinuierlichen Kultur ~ 19 mM Aceton, ~ 39 mM Butanol und ~ 5 mM Ethanol im Kulturüberstand der *pdc*-Integrationsmutante detektiert.

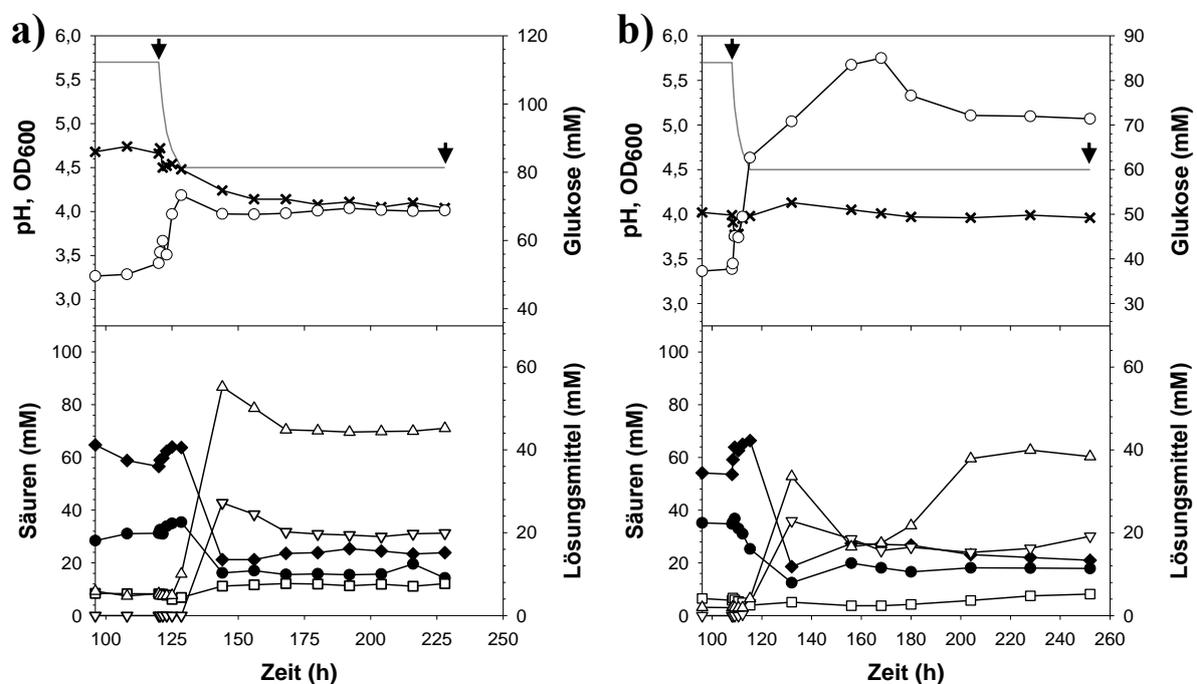


Abbildung 3.28: Fermentationsprofile von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum pdc::int(843)* (b). Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten bis zum Erreichen eines *steady state* Wachstums bei pH 5,7 und pH 4,5 kultiviert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen, um Wachstum (x), pH (–) und Glukosekonzentration (o) verfolgen zu können. Die Fermentationsprodukte Acetat (●), Butyrat (◆), Aceton (▽), Ethanol (□) und Butanol (Δ) wurden mittels Gaschromatographie bestimmt wobei interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden (2.6.3). Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA Microarray Analysen. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Einzelexperiment.

Im Vergleich dazu konnten für Referenzstamm ATCC 824 nach 240 h Produktmengen von ~ 20 mM (Aceton), ~ 45 mM (Butanol) und ~ 8 mM (Ethanol) nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Säuren Acetat sowie Butyrat konnten Konzentrationen von ~ 18 mM und ~ 21 mM, und damit ein mit dem Wildtyp vergleichbarer Titer (~ 14 mM bzw. ~ 24 mM) bestimmt

werden. Für die vergleichenden Transkriptomanalysen erfolgte eine zweite Probennahme von Zellen nach 252 h (*steady state* pH 4,5; Solventogenese).

3.6.3 Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum pdc::int(843)*

Für die Genexpressionsanalyse von *C. acetobutylicum pdc::int(843)* im Vergleich zum Wildtyp *C. acetobutylicum* ATCC 824 wurden Oligo-basierende DNA Microarrays verwendet (2.10). Um eine qualitative und quantitative Auswertung von Expressionsunterschieden zu gewährleisten, wurde stets darauf geachtet, dass die zu untersuchenden Zellproben während des *steady state* und somit bei konstanten endogenen sowie exogenen Parametern entnommen wurden. Für die Analyse der zwei miteinander zu vergleichenden Proben wurden jeweils 2 Microarray-Experimente mit gegenläufiger Cy3-/Cy5-Farbstoffmarkierung durchgeführt (2.10.1), wodurch die Expressionsdaten der Acidogenese (pH 5,7) bzw. Solventogenese (pH 4,5) auf insgesamt 4 Hybridisierungsreaktionen basierten. Transkriptionsänderungen um den Faktor 3 dienten als Schwellenwert, um das Expressionsverhältnis eines Gens als signifikant hochreguliert ($\geq 3,0$) oder reprimiert ($\leq -3,0$) definieren zu können. Die detaillierten Ergebnisse aller signifikant induzierten oder reprimierten Gene sind im Anhang (Tabelle A28, Tabelle A29, Tabelle A30, Tabelle A31) dokumentiert.

3.6.3.1 *Steady state*-Transkriptom bei pH 5,7

Während des acidogenen *steady state* Wachstums bei pH 5,7 wurden in der *pdc*-Mutante 17 Gene (0,4 %) identifiziert, die im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 eine signifikant erhöhte Induktion aufwiesen ($\geq 3,0$). Als signifikant reprimiert ($\leq -3,0$) detektiert wurden 23 Gene (0,6 %). Die Mehrheit aller Gene (91,4 %) zeigte kein um den Faktor 3 verändertes Expressionsverhalten, 7,6 % der Gene wiesen kein Transkript auf oder wurden im Zuge der Auswertung der Daten des DNA Microarrays über die erforderlichen Filterkriterien (2.10.4) aussortiert.

Zwei von den insgesamt 17 ORFs, die mindestens ein $\geq 3,0$ -fach erhöhtes Transkript im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, sind vom Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997a) kodiert. Dabei handelt es sich um die Gene des putativen Operon CAP0057-58 (~4,4-fach), die für ein „Rare lipoprotein A RLPA related protein“ und ein „Putative glycoprotein or S-layer protein“ kodieren. Von den chromosomal kodierten Genen wies CAC2957, ein als „PTS system IIB component (galactitol/fructose specific)“ annotierter ORF, den höchsten

Transkriptanstieg (~117-fach) bei pH 5,7 auf. Weiterhin konnten signifikant gesteigerte Transkriptmengen für CAC0570 (~33-fach), CAC2951-54 (~18,4-fach), CAC2955 (~12-fach), CAC2956 (~65-fach) und CAC2958 (~50-fach) identifiziert werden, Gene die ebenfalls für Phosphotransferase-Systeme (PTS) kodieren.

Unter den insgesamt 23 Genen, die in *C. acetobutylicum pdc::int(843)* im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 während der Acidogenese (pH 5,7) ein signifikant reprimiertes Expressionsverhalten ($\leq -3,0$) aufwiesen, wurden überwiegend für Proteine der Chemotaxis kodierende Gene nachgewiesen. Dazu zählen die ORFs CAC0117-18 (~-3,5-fach), CAC0119-21 (~-3,6-fach), CAC1351-52 (~-4,9-fach) und CAC2533 (~-4,2-fach).

3.6.3.2 *Steady state*-Transkriptom bei pH 4,5

Im Vergleich zur Acidogenese bei pH 5,7 zeigten bei pH 4,5 deutlich mehr Gene der *pdc*-Integrate signifikant erhöhte sowie reprimierte mRNA-Mengen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. So konnte für 125 Gene (3,4 %) ein um mindestens den Faktor 3 gestiegenes Expressionslevel identifiziert werden, während 33 Gene (0,9 %) eine deutlich verringerte Transkription ($\leq -3,0$) aufwiesen (Tabelle A30, Tabelle A31). Insgesamt 96,7 % der Gene wurden nicht signifikant in ihrem Expressionsverhalten beeinflusst, 3,3 % der Gene zeigten kein Transkript oder erfüllten nicht die angewandten Filterkriterien.

Von den insgesamt 125 Genen mit einer signifikant auf der Transkriptebene verstärkten Expression in *C. acetobutylicum pdc::int(843)* wurden 7 vom Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997a) kodiert. Unter ihnen befanden sich die Gene CAP0141-146, die Teil eines gemeinsamen Operons sind. Dabei kodieren CAP0141 (*mbhs*) (~4,9-fach) und CAP0142 (*mbhl*) (~5,5-fach) für die beiden Untereinheiten der putativen [NiFe]-Hydrogenase HupSL (Nölling *et al.*, 2001), das Gen CAP0143 (~5,1-fach) für ein als „Hydrogenase maturation protease delta subunit, HyaD-like“ annotiertes Protein. Auch für das Gen CAC0808 (*hybG*) (~4-fach), das ebenso für ein Hydrogenase-Maturationsprotein kodiert, konnte in der *pdc*-Integrate ein erhöhtes Expressionslevel nachgewiesen werden. Eine signifikant gesteigerte Transkriptmenge in der *pdc*-Mutante konnte für eine hohe Anzahl an Genen mit Bezug zur Sporulation identifiziert werden, was überraschte, da Zellen in einer kontinuierlichen Kultur keine Sporen oder Vosporen ausbilden (Janssen *et al.*, 2010). Zu den induzierten Genen gehörten u.a., CAC0581 (*spoVR*) (~4-fach) und das putative Operon CAC0613-614 (~4,3-fach), die für das „Spore coat protein F“ kodieren, Gene des Sigmafaktors E, CAC1695 (*sigE*) (~4,4-fach), und des Sigmafaktors G, CAC1696 (*sigG*) (~3,8-fach). Ebenso zählten dazu die signifikant erhöhten Transkripte von CAC2086 (~6,4-fach), dem putative Operon CAC2087-

93 (~6-fach) und CAC2859 (*spoIIID*), die allesamt als Gene für verschiedene Proteine vom Typ „Stage III sporulation“ annotiert sind. Eine im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 gesteigerte mRNA-Menge während des *steady state* bei pH 4,5 konnte wie schon bei pH 5,7 für PTS-Systeme kodierende Gene dokumentiert werden. Darunter befinden sich CAC0570 (~23-fach), CAC1457-61 (~12,6-fach), CAC2951-54 (~5,4-fach), CAC2955 (~5,5-fach), CAC2956 (~24,1-fach), CAC2957 (~30,4-fach) und CAC2958 (~13-fach). Auffällig stark induziert waren auch die Gene des putativen Operons CAC0014-17 (~10,3-fach), dessen Genprodukte in der Biosynthese von Serin involviert sind (Schaffer *et al.*, 2002).

Zu den 33 Genen der *pdg*-Mutante, für die im Vergleich zum Wildtyp ein um mindestens den Faktor 3 reprimiertes Expressionsverhältnis nachgewiesen werden konnte, gehörten u.a. Gene die für Proteine des Nitrogenase-Komplexes (CAC0253-56) (~3,9-fach) und „Hypothetical proteins“ (CAP0026, CAC0387, CAC1884-85, CAC1898, CAC1901-03, CAC1905, CAC1908, CAC3633) kodieren. Weiterhin zeigte das chromosomal lokalisierte Gen der Thiolase (*thlA*) (~3-fach) im Vergleich zum Wildtyp. Für das auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisierte paraloge Gen der Thiolase (*thlB*, CAP0078) konnte keine Veränderung in der Expression nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Aufgrund schwindender Rohölvorkommen und ökologischer Gesichtspunkte steht die mikrobielle Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation durch solventogene Clostridien bereits seit mehreren Jahrzehnten im Fokus intensiver Forschung. Dabei richtet sich das Interesse insbesondere auf Butanol, einem Ausgangsstoff für zahlreiche industrielle Komponenten wie z.B. Butylacrylat, Butylmethacrylatester, Butylglykol oder Butylacetat (Mascal, 2012). Auch eine zukunftssträchtige Anwendung als alternativer Kraftstoff („Biobutanol“) ist aufgrund besserer Eigenschaften gegenüber Ethanol möglich (Dürre, 2008; Green, 2011; Jin *et al.*, 2011). Unter den solventogenen Clostridien gilt *C. acetobutylicum* als Modellorganismus (Lee *et al.*, 2008a; Ni & Sun, 2009; Papoutsakis, 2008). Obgleich der Hauptstoffwechselweg dieses Bakteriums mit all seinen beteiligten Enzymen seit über 20 Jahren bekannt ist (Jones & Woods, 1986), sind aufgrund einer langen molekulargenetischen Unzugänglichkeit grundlegende physiologische und regulatorische Mechanismen, wie beispielsweise die Umstellung des Stoffwechsels von der Säure- auf die Lösungsmittelbildung, bisher nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch ist das wissenschaftliche Verständnis der stoffwechselphysiologischen Regulationsmechanismen essentiell, um Ansatzpunkte für die Erzeugung optimierter Produktionsstämme finden zu können. Die intensiven Forschungsaktivitäten in den vergangenen zwei Jahrzehnten gingen mit der Entwicklung zahlreicher Methoden des „Metabolic Engineering“ einher (Lütke-Eversloh, 2014). Dabei erwies sich das ClosTron-System (Heap *et al.*, 2007) als Verfahren zur gezielten Mutagenese von Clostridien Genen besonders vorteilhaft (Kuehne *et al.*, 2011; Kuehne & Minton, 2012) und sollte daher zur Erzeugung stabiler Mutanten des Zentralstoffwechsels von *C. acetobutylicum* ATCC 824 verwendet werden.

Wie der Tabelle 2.2 zu entnehmen ist, konnten im Zuge dieser Arbeit 3 Insertionsmutanten mit Hilfe des ClosTron Gene Knock-Out Systems erzeugt werden. Die Integrationseffizienz variierte von ~14 % für CAC0981 (*pflA*) über ~21 % für CAC0980 (*pflB*), bis hin zu ~44 % für das Gen CAP0025 (*pdC*) und entspricht somit der für *C. acetobutylicum* anzunehmenden Wahrscheinlichkeit von mindestens 2,5 % (Heap, 2009). Die erfolgreiche Insertion des Gruppe-II-Introns in das jeweilige gewünschte Zielgen wurde mittels PCR-Screening ermittelt (Abbildung 3.19, Abbildung 3.26) und zusätzlich durch eine Southern Hybridisierung bestätigt (Abbildung 3.20, Abbildung 3.27). Gleiches gilt für alle weiteren, ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Stämme von *C. acetobutylicum* (2.2) (Cooksley *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2012a; Lehmann *et al.*, 2012b). Die zur Verfügung stehenden

Integrationsmutanten wurden, sofern möglich, in einem Phosphat-limitierten Chemostaten angezogen, eine Form der Kultivierung, die es erlaubt, den biphasischen Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* bei konstanten Wachstumsparametern und unter definierten Wachstumsbedingungen untersuchen zu können (Bahl *et al.*, 1982b).

4.1 Manipulation des Säure- und Aceton-Stoffwechsels

4.1.1 Einfluss der Mutationen auf den Gärungsstoffwechsel

4.1.1.1 *C. acetobutylicum pta::int(80)*

Während der Acidogenese geht der Elektronenfluss größtenteils Richtung H₂-Produktion und der Kohlenstofffluss ist hauptsächlich auf die Säurebildung ausgerichtet, wodurch die größtmögliche Energieausbeute für das anaerobe Wachstum von *C. acetobutylicum* erzielt wird. Dabei spielt insbesondere die Produktion von Acetat eine entscheidende Rolle, da diese im Vergleich zur Biosynthese von Butyrat ein zusätzliches ATP liefert (Abbildung 1.2). Die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat über Acetyl-Phosphat wird katalysiert durch die Enzyme Phosphotransacetylase (Pta) und Acetat-Kinase (Ack), dessen kodierenden Gene in einem gemeinsamen Operon organisiert sind (Boynnton *et al.*, 1996).

In vorangegangenen Studien wurden berichtet, dass die Inaktivierung des *ack*-Gens mit einer reduzierten, aber nicht vollständig ausbleibenden Acetatproduktion einhergeht (Cooksley *et al.*, 2012; Kuit *et al.*, 2012). Geringfügige Mengen an Acetat wurden auch für eine *pta*-Mutante (PJC4PTA) bestimmt, die mittels Insertion einer Antibiotikaresistenz über homologe Rekombination erzeugte wurde (Green *et al.*, 1996). Darüber hinaus konnten im zellfreien Mediumüberstand signifikant gesteigerte Butyratkonzentrationen detektiert werden. In einer nachfolgenden Studie produzierte die PJC4PTA-Mutante jedoch erstaunlicherweise erhöhte Mengen an Butanol, während die Synthese von Butyrat unbeeinflusst blieb (Zhao *et al.*, 2005). Diese zwei voneinander unabhängigen Arbeiten mit demselben Stamm veranschaulichen deutlich die einleitend erwähnten Probleme bezüglich der Reproduzierbarkeit und Interpretation von Batch-Fermentationen. Kürzlich beschrieben Jang *et al.* (2012) eine *pta*-negative Mutante (EKW), die neben einer unveränderten Butyratproduktion erhöhte Konzentrationen an Butanol und Ethanol aufwies. Dieser Phänotyp muss jedoch aufgrund der hier angewandten Mutationsstrategie hinterfragt werden, da das verwendete genspezifische Deletionsplasmid nach der Mutagenese nicht „gecured“ wurde wodurch der genaue Genotyp der Mutante unbekannt ist. Ein weiteres Beispiel dafür, welchen Einfluss die Kultivierungsform hinsichtlich der phänotypischen Charakterisierung einer

Mutante haben kann liefert der Stamm *C. acetobutylicum pta::int(80)*. Die auf dem Clostron-System basierende Integrationsmutante zeichnete sich in Batch-Kultur durch ein gegenüber dem Wildtyp vergleichbares Fermentationsprofil aus (Lehmann *et al.*, 2012a). In Phosphat-limitierter, kontinuierlicher Kultur konnte jedoch während der Acidogenese eine gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 deutlich reduzierte Produktion von Acetat sowie eine signifikant erhöhte Butyratmenge detektiert werden (Abbildung 3.8). Die im Zuge des solventogenen *steady-state* Wachstums bestimmten Lösungsmittelkonzentrationen waren vergleichbar mit dem Wildtyp. Diese Beobachtungen entsprechen dem Phänotyp des Stamms PJC4PTA wie er durch Green *et al.* (1996) beschrieben wurde.

Diese Arbeit eingeschlossen, konnte bisher weder für Mutanten der Pta noch Ack ein eindeutig Acetat-negativer Phänotyp nachgewiesen werden. *C. acetobutylicum pta::int(80)* produzierte in kontinuierlicher Kultur ~5 mM Acetat (Abbildung 3.8). Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Phosphotransbutyrylase (Ptb) und die Butyrat-Kinase (Buk) aufgrund überlappender Substratspezifitäten höchstwahrscheinlich ebenfalls zur Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat befähigt sind. Für die Ptb konnte eine relative Aktivität mit Acetyl-CoA von 2 % und für Buk eine Aktivität von 6 % mit Acetat gegenüber Butyryl-CoA bzw. Butyrat bestimmt werden (Hartmanis, 1987; Wiesenborn *et al.*, 1989b). Die mit der verringerten Acetatproduktionsrate einhergehende Einschränkung der für das Zellwachstum benötigten ATP-Generierung konnte durch *C. acetobutylicum pta::int(80)* über eine erhöhte Produktion von Butyrat (40 %) kompensieren werden. Dies korreliert mit der Hypothese, dass bei einer niedrigen ATP-Konzentration in der Zelle die Produktion von Säuren unterstützt wird (Papoutsakis, 1983).

4.1.1.2 *C. acetobutylicum adc::int(180)*

Eine zentrale Funktion bei der Lösungsmittelbildung nehmen das *adc*- und *sol*-Operon ein (Sauer & Dürre, 1995). Das monocistronisch organisierte *adc*-Gen (Gerischer & Dürre, 1992) kodiert für die Acetoacetat-Decarboxylase (Adc). Das aus 12 identischen Untereinheiten bestehende Enzym katalysiert den zweiten und letzten Schritt der Acetonproduktion, die Decarboxylierung des durch die Aktivität der CoA-Transferase (CoAT) bereitgestellten Acetoacetats (Abbildung 1.2) (Gerischer & Dürre, 1990; Petersen & Bennett, 1990; Petersen *et al.*, 1993). Die CoA-Transferase wird durch die Gene *ctfA* und *ctfB* kodiert, die in dem stromaufwärts des *adc*-Operons lokalisierten polycistronischen *sol*-Operon organisiert sind (Fischer *et al.*, 1993). *C. acetobutylicum* zeigt typischerweise ein ABE-Verhältnis von 3:6:1 (Lee *et al.*, 2012; Mitchell, 1998), womit Aceton das zweitgrößte Fermentationsprodukt nach

Butanol darstellt (Lee *et al.*, 2008b). Aceton wird jedoch als ein unerwünschtes Nebenprodukt angesehen, da es aufgrund seiner korrosiven Eigenschaften gegenüber Motorenteilen, die aus Plastik oder Gummi bestehen, nicht als Biokraftstoff verwendet werden kann (Gu *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang wurden bisher zwei Strategien verfolgt: (1) die Reduktion von Aceton zu Isopropanol durch die Expression des für eine Alkohol-Dehydrogenase kodierenden Gens *sadh* aus *C. beijerinckii* NRRL B593 (Collas *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2012; Dusséaux *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2012) und (2) eine verringerte Expression oder Deletion der an der Biosynthese von Aceton beteiligten Gene.

In einer früheren Studie konnte die Genexpression des *adc*-Gens erfolgreich durch Anwendung der Antisense-RNA (asRNA) Technologie verringert werden, jedoch zeigte dieser Stamm keine Veränderung hinsichtlich der Acetonbildung, weshalb man vermutete, dass der Gehalt der CoAT den limitierenden Faktor für die Produktion dieses Lösungsmittels darstellt (Tummala *et al.*, 2003b). Für die CoAT-asRNA-Mutanten konnten neben einer deutlich reduzierten Acetonproduktion auch signifikant verringerte Mengen an Butanol detektiert werden. Eine zusätzliche Überexpression des *adhE1*-Gens (CAP0162) stellte nicht nur die Bildung von Butanol wieder her, sondern ging auch mit einer drastisch erhöhten Ethanolproduktion einher (Sillers *et al.*, 2009; Tummala *et al.*, 2003a). Später wurde die TargeTron-Technologie verwendet, um die Acetoacetat-Decarboxylase in *C. acetobutylicum* EA2018, einem durch chemische Mutagenese entstandenen „Hyper-Butanol-Stamm (Hu *et al.*, 2011; Ni & Sun, 2009), zu deletieren (Jiang *et al.*, 2009). Diese *adc*-negative Mutante zeichnete sich durch eine drastisch reduzierte Acetonproduktion, eine deutliche Akkumulierung von Acetat sowie verringerte Mengen an Butanol aus. Die mittels ClosTron erzeugte Mutante *C. acetobutylicum adc::int(180)* wies in Batch-Kultur einen vergleichbaren Phänotyp auf (Lehmann *et al.*, 2012a). Eine Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgte durch Cooksley *et al.* (2012), deren Stamm *Cac-adc180s::CT* auf dem gleichen Mutagenese-System und einer identischen Intron-Insertionsstelle basiert.

In kontinuierlicher Kultur wurden für *C. acetobutylicum adc::int(180)*, übereinstimmend mit den Batch-Kulturen, während des solventogenen Wachstums geringfügige Mengen an Aceton nachgewiesen (Abbildung 3.9), deren Produktion durch eine spontan ablaufende Decarboxylierung des sehr instabilen Acetoacetats erklärt werden kann (Boyd *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2011). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Reassimilation von Acetat ausblieb, weshalb im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 weitaus höhere Acetat-Endkonzentrationen messbar waren. Durch die Inaktivierung der Adc kommt es zu einer Akkumulation von Acetoacetat. Dieser Überschuss hat eine Hemmung der CoA-Transferase-

Aktivität zur Folge, wodurch die Wiederaufnahme des Acetats unterbleibt (Jiang *et al.*, 2009). Die Decarboxylierung von Acetoacetat zu Aceton scheint die Reassimilation der Säuren zu unterstützen, ein Zusammenhang der erstmals durch Andersch *et al.* (1983) beschrieben wurde. Für die der Adc zugeschriebenen Rolle als „treibende Kraft“ der Solventogenese (Gheshlaghi *et al.*, 2009) spricht zudem die Tatsache, dass *C. acetobutylicum adc::int(180)* gegenüber dem Wildtyp signifikant reduzierte Konzentrationen an Butanol aufwies. Interessanterweise, wurden im Zuge des „metabolic shifts“ ca. 90 % des während der Acidogenese (pH 5,7) produzierten Butyrats wieder aufgenommen (Abbildung 3.9). Diese Beobachtung bekräftigt einerseits die Vermutung einer Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase- (CtfAB) und Adc-abhängigen Reassimilation von Acetat (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008b; Lehmann *et al.*, 2012a; Sillers *et al.*, 2008) und andererseits, dass in *C. acetobutylicum* die Wiederaufnahme von Butyrat nicht zwangsläufig mit der Acetonproduktion verbunden ist (Jiang *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2012b).

4.1.1.3 *C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-ptA::int(80)*

Da *C. acetobutylicum adc::int(180)* im Batch-Fermentationsmaßstab eine gesteigerte Acetatproduktion aufwies, erfolgte, in der Hoffnung den Gärungsstoffwechsel in Richtung Butanol zu verschieben, eine zusätzliche Inaktivierung der Phosphotransacetylase (Lehmann *et al.*, 2012a). Dazu wurde die RAM-Kassette in der *adc*-Integrate mit Hilfe einer FLP (Flippase) Rekombinase entfernt (Heap *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2011), wodurch dieser Stamm zur Herstellung von *C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-ptA::int(80)* mit dem *pta*-spezifischen pMTL007C-E2 Vektor verwendet werden konnte. Der Verlust der Erythromycin-Resistenz ermöglichte eine weitere Insertion des kompletten Gruppe-II-Introns und somit eine erneute Selektion mittels Erythromycin.

C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-ptA::int(80) offenbarte in Batch-Kultur eine drastisch verringerte Acetatproduktion, deutlich erhöhte Mengen an Butyrat sowie eine Zunahme der Laktatbildung (Lehmann *et al.*, 2012a). Neben geringen Mengen an Aceton konnten zudem signifikant reduzierte Konzentrationen an Butanol und Ethanol im zellfreien Kulturüberstand detektiert werden. Obwohl der Kohlenstofffluss offensichtlich Richtung Butyryl-CoA verschoben wurde, führte die Kombination einer Inaktivierung der Adc und Pta letztendlich nicht zu einer Verschiebung Richtung Butanol, sondern zu einer gesteigerten Butyratproduktion. Die im Rahmen pH-unkontrollierter Batch-Fermentationen durchgeführten Wachstumsversuche ließen vermuten, dass die geringe Lösungsmittelproduktion ein Resultat des sogenannten „Acid Crash“ ist. Hierbei tritt, bedingt

durch eine rasche Anhäufung undissoziierter Säuren, ein toxischer Effekt ein, wodurch der „switch“ zur Solventogenese ausbleibt (Kumar *et al.*, 2013; Maddox *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2011). In der pH-kontrollierten kontinuierlichen Kultur offenbarte die Doppel-Knock-Out-Mutante im Zuge des acidogenen Wachstums (pH 5,7) einen durch die Inaktivierung der Pta hervorgerufenen Acetat-armen Phänotyp, während Butyrat das Hauptfermentationsprodukt darstellte (Abbildung 3.10). Wie schon im Rahmen der physiologischen Charakterisierung durch Lehmann *et al.* (2012a), konnten zudem deutlich reduzierte Mengen an Butanol und Ethanol sowie eine ausbleibende Acetonproduktion dokumentiert werden. Dabei wies die Doppel-Integrierte mit $1,62 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gegenüber $4,86 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (WT), $4,01 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (*pta::int(80)*) und $2,12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (*adc::int(180)*) die geringste ABE-Produktion auf, was auch durch die niedrigste Ausbeute an Lösungsmitteln bezogen auf den Glukoseverbrauch ($0,065 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$) wiedergespiegelt wurde (Anhang, Tabelle A16). Dieses Ergebnis verdeutlicht einerseits die Komplexität des Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* und zeigt andererseits die Schwierigkeit auf, den Metabolismus zu Gunsten von Butanol als erwünschtes Endprodukt zu manipulieren. *C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)* lieferte dennoch wertvolle Informationen. Durch die deutliche Abnahme der Butyratkonzentration im Zuge des „shifts“ von der Acidogenese zur Solventogenese konnte erneut die Annahme bekräftigt werden, dass in *C. acetobutylicum* die Reassimilation von Butyrat über einen *ctfAB/adc*-unabhängigen Weg erfolgt (Hönicke *et al.*, 2014).

4.1.1.4 *C. acetobutylicum ptb::int(87)*

Zusätzlich zu Acetat bildet *C. acetobutylicum* während des exponentiellen Wachstums signifikante Mengen an Butyrat, die nach der Transition zum stationären Wachstum wieder reassimiliert werden (Lee *et al.*, 2008b). Somit wurden die Phosphotransbutyrylase (Ptb) und die Butyrat-Kinase (Buk), die Enzyme die es ermöglichen Butyryl-CoA unter ATP-Bildung zu Butyrat umzuwandeln (Cary *et al.*, 1988), ebenfalls zu einem Ziel für Versuche, durch „Metabolic Engineering“ die Nebenproduktbildung zu Gunsten einer erhöhten Butanolproduktion zu verringern.

Analog zu *C. acetobutylicum* PJC4PTA, erfolgte die Erzeugung einer Buk-Knock-Out Mutante (PJC4BK) durch Insertion einer Antibiotikaresistenz mittels homologer Rekombination eines nicht-replikativen Plasmids (Green *et al.*, 1996). Dieser Stamm wies eine verringerte Bildung von Butyrat auf, zeigte jedoch keinen Butyrat-negativen Phänotyp, weshalb man annahm, dass die Ptb das Hauptenzym der Butyratsynthese darstellt. Weiterhin wurde, sowohl gegen das *buk*- (CAC3075) als auch das *ptb*-Gen (CAC3076), die Antisense-

RNA Technologie angewandt (Desai *et al.*, 1999; Desai & Papoutsakis, 1999). Der *buk*-asRNA-Stamm *C. acetobutylicum* pRD4 zeichnete sich im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle durch eine frühere und höhere Lösungsmittelproduktion aus. Für die *ptb*-asRNA-Mutante (pRD1) konnte hingegen eine deutliche Inhibierung der Solventogenese sowie signifikant gesteigerte Mengen an Laktat dokumentiert werden. Eine reduzierte Butyratproduktion war interessanterweise, trotz verringerter Enzymaktivitäten, für keinen der beiden Stämme nachweisbar. Ein auf Insertion einer Antibiotikaresistenz durch homologe Rekombination basierender Knock-Out des *ptb*-Gens in *C. tyrobutyrium* ATCC 25755 ging mit einer erhöhten Produktion von Acetat und Wasserstoff einher, während die Butyratkonzentration sich nur geringfügig vom Wildtyp unterschied (Zhang *et al.*, 2012). Als mögliche Erklärung galt, die bereits durch Green *et al.* (1996) postulierte Existenz von Ptb- und Buk-Isoenzymen. Dazu gehört u.a. die erstmals im Jahre 2000 für *C. acetobutylicum* beschriebene Butyratkinase II (CAC1660) (Huang *et al.*, 2000). Tatsache war jedoch auch, dass die bis dato existierenden Mutanten eine maximale Abnahme der Ptb- und Buk-Enzymaktivität von höchstens 80 % aufzeigten (Desai & Papoutsakis, 1999; Green *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2012). Mit *C. acetobutylicum ptb::int(87)* konnte erstmals eine Mutante beschrieben werden, die aufgrund einer 99 %igen Reduktion der Ptb-Aktivität kein Butyrat mehr bildete (Lehmann *et al.*, 2012b). Der Butyrat-negative Phänotyp konnte später durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt werden, die ebenfalls das ClosTron-System verwendeten, jedoch für die Integration des Gruppe-II-Introns in das *ptb*-Gen eine andere Insertionsstelle auswählten (Cooksley *et al.*, 2012). Beide Mutanten zeichneten sich zudem durch signifikant erhöhte Acetat-, Ethanol- und Laktatkonzentrationen aus. In einer weiteren Studie wurde das für die Ptb kodierende Gen mittels einer modifizierten Intron-basierten Strategie inaktiviert (Jang *et al.*, 2012). Der daraus resultierende Stamm (PKW) wies jedoch nahezu mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen an Acetat und Butyrat auf. Dieser Phänotyp untermauert den Zweifel an der hier angewandten Mutationsstrategie, wie er bereits im Zusammenhang mit der ebenfalls aus dieser Arbeit stammenden *pta*-negativen Mutante (EKW) erhoben wurde (4.1.1.1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *C. acetobutylicum ptb::int(87)* in einem Phosphat-limitierten Chemostaten kultiviert und offenbarte dabei ein Produktspektrum mit einigen Gemeinsamkeiten aber auch wesentlichen Unterschieden gegenüber dem der Batch-Kulturen (Abbildung 4.29). Der Butyrat-negative Phänotyp konnte bestätigt werden und scheint auch hier Ursache für eine gesteigerte Acetatproduktion zu sein (Abbildung 3.15), um die Zelle ausreichend mit ATP zu versorgen (Harris *et al.*, 2000; Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Die Tatsache, dass Butyrat zu keinem Zeitpunkt im zellfreien Kulturüberstand der *ptb*-Integrierte

detektiert werden konnte deutet darauf hin, dass die an der Bildung von Acetat beteiligten Enzyme nicht in der Lage sind die Phosphotransbutyrylase-Reaktion zu ersetzen (Lehmann *et al.*, 2012b).

a)

Produkte (mM)	WT 9 h	WT 120 h	Ptb 9 h	Ptb 120 h
Acetat	17,55 ± 1,49	5,78 ± 1,38	16,28 ± 1,62	62,81 ± 4,44
Butyrat	20,29 ± 0,86	8,78 ± 1,34	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aceton	0,00 ± 0,00	99,05 ± 10,40	0,00 ± 0,00	1,86 ± 0,05
Butanol	0,00 ± 0,00	145,53 ± 8,77	0,00 ± 0,00	59,54 ± 12,57
Ethanol	1,23 ± 0,46	19,07 ± 3,01	1,23 ± 0,46	10,78 ± 0,88
Laktat	0,19 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,06	12,95 ± 4,77
OD ₆₀₀	3,97 ± 0,14	2,46 ± 0,09	3,97 ± 0,14	2,32 ± 0,13

b)

Produkte (mM)	8,75 h ± 0,35 h		14,875 h ± 1,94 h		6,21 h ± 0,77 h	
	WT pH 5,7	WT pH 4,5	Ptb pH 5,7	Ptb pH 4,5	Ptb* pH 5,7	Ptb* pH 4,5
Acetat	29,96 ± 1,78	13,18 ± 1,56	57,39 ± 5,23	19,55 ± 2,82	66,60 ± 1,82	25,59 ± 2,62
Butyrat	54,89 ± 2,35	22,02 ± 2,60	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	20,35 ± 3,12	9,03 ± 0,23
Aceton	0,00 ± 0,00	18,80 ± 1,58	0,00 ± 0,00	22,49 ± 2,59	0,00 ± 0,00	9,33 ± 0,88
Butanol	4,39 ± 0,56	43,86 ± 1,88	27,40 ± 2,70	43,43 ± 4,33	33,51 ± 0,97	26,07 ± 4,28
Ethanol	5,06 ± 0,25	8,18 ± 0,64	2,76 ± 0,64	10,26 ± 1,17	3,85 ± 0,27	15,27 ± 3,62
Laktat	0,34 ± 0,06	0,16 ± 0,01	0,72 ± 0,05	3,78 ± 0,06	5,10 ± 0,26	0,00 ± 0,00
OD ₆₀₀	4,60 ± 0,09	4,01 ± 0,05	3,99 ± 0,02	3,78 ± 0,06	2,96 ± 0,20	3,71 ± 0,12

Abbildung 4.29: Vergleichende Darstellung der Produktspektren von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*. Die mittels Gaschromatographie (2.6.3) sowie enzymatischer Bestimmung (2.6.5) im Rahmen von Batch- (3.3.1.1.1) (a) und Kontinuierlichen Kultivierungen (3.3.1.1.2, 3.3.1.1.3) (b) detektierten Fermentationsprodukte sind als Mittelwert (n=2) mit entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. WT: *C. acetobutylicum* ATCC 824; Ptb: *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*; Ptb*: *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* in Gegenwart von 20 mM Butyrat. Die über dem Pfeil angegebene Zeit gibt die Dauer des „pH-shifts“ wieder.

Die im Laufe des solventogenen steady-state Wachstums (pH 4,5) detektierten Mengen an Aceton waren mit denen des Referenzstamms ATCC 824 vergleichbar. Im Gegensatz dazu wurde die Bildung von Aceton im Batch-Maßstab drastisch reduziert (~2,1 mM) (Abbildung 4.29). Weiterhin stellte Ethanol nicht länger ein dominierendes Fermentationsprodukt dar (Abbildung 3.15), wie es für pH ≥5,0-regulierten Batch-Kultivierungen aufgezeigt werden konnte (Lehmann *et al.*, 2012b). In Batch-Kultur konnte für die *ptb*-Mutante eine gesteigerte Laktatbildung über die Acidogenese hinaus beobachtet werden (Abbildung 4.29). In

kontinuierlicher Kultur hingegen war Laktat lediglich im Rahmen des Experimentes mit 20 mM Butyrat im Frischmedium (3.3.1.1.3) und nur in geringfügigen Konzentrationen (5-7 mM) während der Acidogenese sowie im Zuge des „pH-shifts“ nachweisbar (Anhang, Abbildung A33). Besonders bemerkenswert war jedoch, dass *C. acetobutylicum ptb::int(87)* während der Acidogenese bei pH 5,7, sowohl mit als auch ohne extern zugeführtem Butyrat, signifikante Mengen an Butanol produzierte (Abbildung 3.15, Abbildung 3.16) und somit das langjährige Dogma eines niedrigen pH als unumgängliche Voraussetzung für die Biosynthese von Lösungsmitteln in *C. acetobutylicum* herausfordert (Bahl *et al.*, 1982a; Gottwald & Gottschalk, 1985; Holt *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1985). Durch die Kultivierung in Gegenwart von Butyrat konnte zudem aufgezeigt werden, dass Butanol nicht zwangsläufig aus reassimilierten Butyrat synthetisiert wird. Dem bei pH 5,7 beobachteten Produktspektrum (Produktion von Butanol und Ethanol, nicht aber Aceton) zur Folge, scheint es als wäre die *ptb*-Integrate zu einem alkohologenen Metabolismus übergegangen. Charakteristisch für diesen physiologischen Zustand sind unter anderem auch ein erhöhter NADH-Level sowie eine verringerte Säureproduktion (Fontaine *et al.*, 2002; Girbal & Soucaille, 1994; Peguin *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994). Letzteres wird dadurch unterstützt, dass bedingt durch die fehlende Butyratsynthese, *C. acetobutylicum ptb::int(87)* gegenüber dem Wildtyp insgesamt eine geringere Gesamtsäureproduktion aufweist. Ein früherer „shift“ zur Lösungsmittelproduktion konnte bereits für andere durch „Metabolic Engineering“ veränderte *C. acetobutylicum*-Stämme berichtet werden (Desai & Papoutsakis, 1999; Scheel & Lütke-Eversloh, 2013; Sillers *et al.*, 2009; Wietzke & Bahl, 2012). Mit Ausnahme der Buk-Mutante PJC4BK (Harris *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2005), konnte jedoch keiner dieser Stämme eine klare Abgrenzung beider Stoffwechselphasen oder eine deutliche Butanolproduktion während des acidogenen Wachstums aufzeigen. Hinzu kommt die Tatsache, dass die Ergebnisse der vorherigen Studien auf Batch-Fermentationen basieren. Eine Interpretation dieser ist bedingt durch Reaktionen auf wechselnde Wachstumsraten oder variierenden Substrat- und Produktkonzentrationen schwierig. Phosphat-limitierte Chemostaten hingegen sind hervorragend geeignet, um den Wechsel von der Acidogenese zur Solventogenese eindeutig von derartigen physiologischen Prozessen abzutrennen (Grimmler *et al.*, 2011). Bedingt durch die Tatsache, dass *C. acetobutylicum ptb::int(87)* nicht mehr zur Bildung von Butyrat befähigt ist, stellte dieser Stamm eine hervorragende experimentelle Grundlage dar, um neue Erkenntnisse über die seit Jahren umfangreich diskutierte Reassimilation der Säuren zu erhalten. Im Rahmen der kontinuierlichen Kultivierung der *ptb*-Integrate in Gegenwart von 20 mM Butyrat (3.3.1.1.3) konnte während des solventogenen Wachstums nur noch ungefähr

die Hälfte der extern zugeführten Menge im zellfreien Mediumüberstand nachgewiesen werden, was im Einklang mit vorherigen Daten aus Butyrat Fed Batch Fermentationen (Lehmann *et al.*, 2012b) stand. Vor diesem Hintergrund und basierend auf der Grundlage aktueller Forschungsergebnisse, galt es das System zur Wiederaufnahme der Säuren erneut zu diskutieren und ist daher Thema des folgenden Kapitels.

4.1.2 Säure-Reassimilation

Die Reassimilation der Säuren wird seit langem kontrovers diskutiert. Frühe Studien deuteten bereits darauf hin, dass die Wiederaufnahme von Acetat, im Gegensatz zu Butyrat, in einer Abhängigkeit zur Acetonbildung steht (Andersch *et al.*, 1983; Desai *et al.*, 1999; Hartmanis *et al.*, 1984; Jones & Woods, 1986; Meyer *et al.*, 1986). Einen experimentellen Beweis dafür lieferten *C. acetobutylicum*-Stämme mit einem Defekt im Acetonstoffwechsel (Abbildung 4.30). Derartige Mutanten offenbarten eine gesteigerte Acetatproduktion ohne anschließende Reassimilation, während für Butyrat eine deutliche Wiederaufnahme im Zuge der Umstellung des Stoffwechsels auf die Solventogenese nachgewiesen werden konnte (Cooksley *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2012a). Interessanterweise, ist *C. acetobutylicum* ungeachtet einer Ptb-Inaktivierung befähigt extern zugeführtes Butyrat aufzunehmen (Lehmann *et al.*, 2012b) (Abbildung 4.30). Zusammenfassend bedeutet dies, dass bei einer inaktivierten bzw. in der Aktivität eingeschränkten CtfA/B kein Acetat aber Butyrat reassimiliert wird, jedoch trotz einer deletierten Phosphotransbutyrylase Acetat und Butyrat wieder aufgenommen werden können. *C. acetobutylicum* muss somit folglich eine zusätzliche Möglichkeit zur Reassimilation von Butyrat haben. Eine Theorie besagt, dass Butyrat durch eine umgekehrt ablaufende Reaktion der Ptb und Buk wieder aufgenommen werden kann (Wiesenborn *et al.*, 1989b). Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass eine homologe Überexpression des *ptb*- und *buk*-Gens zu einer reduzierten und nicht erhöhten Butyratkonzentration führte (Walter *et al.*, 1994). Eine reverse Funktionalität der beiden Enzyme konnte auch in einem auf die Biosynthese von PTEs (Polythioester) spezialisierten rekombinanten *E.coli*-Stamm nachgewiesen werden (Lütke-Eversloh *et al.*, 2002; Thakor *et al.*, 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene *ptb*-Integrierte zeigte eine restliche Buk-Aktivität von 23 % (Lehmann *et al.*, 2012b), weshalb eine Reassimilation von Butyrat durch die Butyrat-Kinase nicht ausgeschlossen werden kann. Eine biochemische Charakterisierung des aufgereinigten CtfA/B-Enzyms ergab eine eindeutige Präferenz für Acetat als Substrat, doch konnte auch eine Aktivität von 26 % für Butyrat als CoA-Akzeptor gemessen werden (Wiesenborn *et al.*, 1989a). Dies lässt folgende Vermutung zu: Ist der

Stoffwechselweg zur Acetonbildung unterbrochen, können Ptb und Buk möglicherweise die Reassimilation von Butyrat ersetzen; ist Ptb inaktiviert, sind CtfA/B und Adc möglicherweise exklusiv für die Aufnahme von Butyrat verantwortlich (Lehmann *et al.*, 2012b). Es ist jedoch auch denkbar, dass beide Reaktion gleichzeitig ablaufen. Dafür sprechen die Untersuchungen durch Zhao *et al.* (2005). Sie konnten für den *pta*-negativen Stamm PJC4PTA sowie *C. acetobutylicum* ATCC 824 im Gegensatz zur Buk-Mutante (PJC4BK) zwei Konzentrationspeaks für Butyryl-Phosphat detektieren. Die Autoren schlussfolgerten, dass der zweite Butyryl-Phosphat- und der einzelne Acetyl-Phosphat-Peak der Reassimilation durch CtfA/B zugeschrieben werden kann, während der erste Peak von Butyryl-Phosphat möglicherweise auf die Umkehrreaktion der Butyratsynthese zurückzuführen ist.

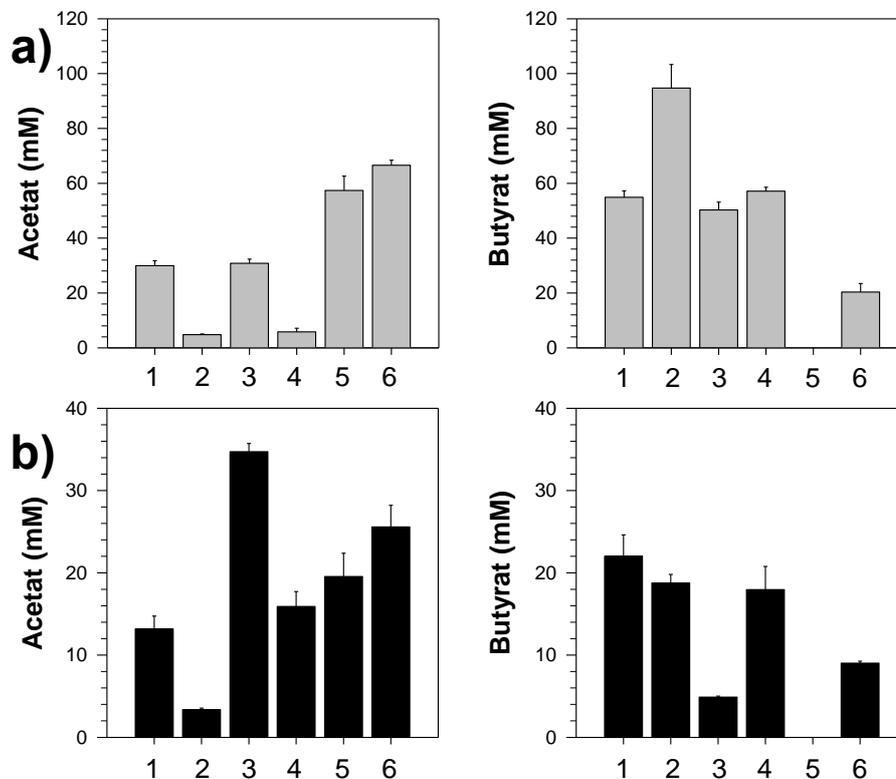


Abbildung 4.30: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von Defektmutanten des Säure- und Acetonstoffwechsels. Gezeigt sind die im Rahmen kontinuierlicher Kultivierungen (3.2.1, 3.3.1.1.2, 3.3.1.1.3) mittels Gaschromatographie (2.6.3) detektierten Konzentrationen der Fermentationsprodukte Acetat und Butyrat. Dargestellt ist der für die Acidogenese (a) und die Solventogenese (b) bestimmte Mittelwert ($n=2$) mit entsprechenden Standardabweichungen. 1: *C. acetobutylicum* ATCC 824; 2: *C. acetobutylicum pta::int(80)*; 3: *C. acetobutylicum adc::int(180)*; 4: *C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)*; 5: *C. acetobutylicum ptb::int(87)*; 6: *C. acetobutylicum ptb::int(87)* in Gegenwart von 20 mM Butyrat.

Die Bildung von Butyryl-CoA aus Butyryl-Phosphat kann vielleicht auch durch eine andere Phosphotransferase erfolgen (Lehmann, 2012). Es ist somit nach wie vor nicht möglich, den genauen Mechanismus zur Wiederaufnahme von Butyrat zu definieren. Die vorhandenen

Ergebnisse unterstützen jedoch die Annahme einer CtfAB/Adc-abhängigen Reassimilation von Acetat in *C. acetobutylicum* (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008b; Lehmann *et al.*, 2012a; Sillers *et al.*, 2008), während die Wiederaufnahme von Butyrate nicht mit der Acetonproduktion verbunden ist (Lehmann *et al.*, 2012b).

4.1.3 DNA-Microarray-Analysen

Auf Basis der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kontinuierlichen Kultivierungen sollte eine globale Analyse des Transkriptoms erfolgen, um neue Erkenntnisse über den komplexen Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* zu erhalten. Die hohe Reproduzierbarkeit der zu untersuchenden Zellproben macht die Anwendung von Chemostat-Kulturen zu einem adäquaten System für die DNA-Microarray-Technologie. Die in früheren Studien im Batch-Maßstab durchgeführten vergleichenden Genexpressionsanalysen lieferten wertvolle Informationen für ein besseres Verständnis der stoffwechselphysiologischen Regulationsmechanismen von *C. acetobutylicum*, unterlagen jedoch aufgrund vieler mit dieser Kultivierungsform einhergehenden wechselnder Parameter, wie z.B. Wachstumsrate, pH und Substratkonzentration, dem Nachteil schwieriger Reproduzierbarkeit (Grimmler *et al.*, 2011). Um mögliche „Schlüsselgene“ detektieren zu können, welche in den Wechsel von der Säure- zu Lösungsmittelphase involviert sind bzw. diese beiden Phasen reflektieren, sollten zunächst die Mutanten untersucht werden, die einen Defekt im Säure- und/oder Aceton-Stoffwechsel aufweisen.

Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2. Die auffälligsten Expressionsänderungen wurden für das *adhE2*-Gen (CAP0035) detektiert. Dieses ist auf dem Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997a) in einem monocistronischen Operon etwa 47 kbp entfernt vom *adhE1*-Gen (CAP0162) lokalisiert und kodiert für eine zweite NADH-abhängige Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase (Fontaine *et al.*, 2002). *C. acetobutylicum* repräsentiert bis jetzt den einzigen Organismus, der zwei derartige Gene aufweist (Dürre *et al.*, 1995). Während CAP0035 in der *adc*-Mutante reprimiert wurde, waren für die *pta*-, die *adc/pta*- und die *ptb*-Integrate eine zwei- bis dreistellig erhöhte Transkriptmenge des *adhE2*-Gens nachweisbar (Tabelle 3.9, Tabelle 3.11). Obwohl die genauen regulatorischen Mechanismen noch als unaufgeklärt gelten, wird eine Expression des *adhE2*-Gens in Abhängigkeit zum Redoxstatus der Zelle, der wiederum durch das NAD(P)H/NAD(P)⁺-Verhältnis reflektiert wird (de Graef *et al.*, 1999), angenommen (Fontaine *et al.*, 2002; Hönicke *et al.*, 2012; Wietzke & Bahl, 2012). Wang *et al.* (2013) identifizierten CAP0035 als eines von mehreren Operons, die in *C. acetobutylicum* mutmaßlich durch Rex (CAC2713) reguliert werden. Dabei handelt es sich um einen

Transkriptionsregulator, der Veränderungen im intrazellulären Redoxhaushalt sensorisch erkennt und daraufhin die Expression von Genen des Fermentationsmetabolismus reguliert (Gyan *et al.*, 2006; McLaughlin *et al.*, 2010; Pagels *et al.*, 2010; Ravcheev *et al.*, 2012; Wietzke & Bahl, 2012). Repressoren der Rex-Familie binden an spezifische „inverted repeats“ (IR) in den Promotorbereichen ihrer Zielgene, den sogenannten Rex-Boxen (Wang *et al.*, 2008). Bei einem geringen NADH/NAD⁺-Verhältnis inhibiert Rex die Gentranskription, dissoziiert jedoch von der Operatorstelle sobald dieses steigt (Brekasis & Paget, 2003). Demnach würde die signifikant erhöhte Transkriptmenge des *adhE2*-Gens der Stämme *pta::int(80)*, *ptb::int(87)* und *adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)* das Ergebnis eines erhöhten NADH/NAD⁺-Levels sein. Steigende NADH-Konzentrationen in der Zelle werden jedoch mit einem Anstieg der Alkoholkonzentration assoziiert (Girbal & Soucaille, 1994; Girbal *et al.*, 1995b; Grupe & Gottschalk, 1992; Meyer & Papoutsakis, 1989; Vasconcelos *et al.*, 1994). Für die *ptb*-Mutante konnten während des acidogenen Wachstums bei pH 5,7 bis zu ~34 mM Butanol nachgewiesen werden (Tabelle A16). Sowohl für *pta*- als auch die Doppel-Knock-Out-Mutante war hingegen keine signifikante Veränderung bezüglich der Ethanol- oder Butanolproduktion zu beobachten. Dies lässt einerseits vermuten, dass CAP0035 möglicherweise nicht an der Alkoholbildung beteiligt ist und andererseits die Expression des *adhE2*-Gens wahrscheinlich nicht allein durch Rex reguliert wird (siehe auch 4.2.2).

CAP0036/CAP0037. Besonders bemerkenswert war auch das Transkriptionsverhalten der pSOL1-kodierten (Cornillot *et al.*, 1997a) Gene CAP0036 und CAP0037. Während die Expression in der *adc*-Mutante in keiner Weise signifikant auf der Transkriptionsebene beeinflusst wurde, wiesen die Doppel-Knock-Out-Mutante und der *pta*-Stamm eine deutliche Induktion im Zuge des solventogenen Wachstums bei pH 4,5 auf. In der *ptb*-Mutante waren CAP0036 und CAP0037 im Gegensatz dazu deutlich reprimiert, unabhängig davon, ob dem Frischmedium Butyrat zugesetzt wurde oder nicht. Die beiden Gene sind bisher als „Uncharacterized gene products with unknown function“ annotiert (Nölling *et al.*, 2001) und bilden eine bicistronische Transkriptionseinheit mit einer Länge von ~1,4 kb (Janssen *et al.*, 2010). Die physiologische Rolle von CAP0036/CAP0037 gilt bis heute als unaufgeklärt. Es wurde postuliert, dass CAP0036/CAP0037 als potentielle Regulatoren der Acetoacetat-Decarboxylase (*Adc*) fungieren und somit eine Rolle im solventogenen „shift“ einnehmen (Schiel, 2006). Die Detektion einer hohen Konzentration beider Polypeptide in 2D-Gelen (Janssen *et al.*, 2010; Schaffer *et al.*, 2002) sowie die Transkriptomdaten des dynamischen „pH-shifts“ von Grimmeler *et al.* (2011) sprechen jedoch gegen diese Hypothese. Eine auf dem ClosTron-System (Heap *et al.*, 2007) basierende Integrationsmutante des Gens CAP0036

offenbarte während der Acidogenese (pH 5,7) einer kontinuierlichen Kultivierung eine gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 signifikant erhöhte Expression von Sporulationsgenen bzw. verantwortlichen Sigmafaktoren sowie von Genen mit einer potentiellen Funktion in der Zell-Umhüllung („Cell envelope biogenesis“) (Janssen, 2010). Diese Induktion war überraschend, da unter den gewählten Kultivierungsbedingungen im Wildtyp die Sporulation nicht ausgelöst wird. Ein signifikanter Einfluss auf die Transkription von Genen mit einer Funktion in der Ausbildung oder im Aufbau der Spore konnte weder für die *pta*-, die *ptb*- noch die Doppel-Knock-Out-Mutante detektiert werden. Datenbank-Analysen sagten für das Protein CAP0037 eine Transmembran-Domäne am C-Terminus hervor, während CAP0036 eine „Domain of unknown function (DUF583)“ aufweist (Janssen *et al.*, 2010). Mit *C. pasteurianum*, *C. ljungdahlii* und dem toxischen Stamm *C. difficile* besitzen auch weitere Stämme der Gattung *Clostridium* ein homologes putatives Operon, wobei im letztgenannten die Anordnung der Gene vertauscht ist (Abbildung 4.31).

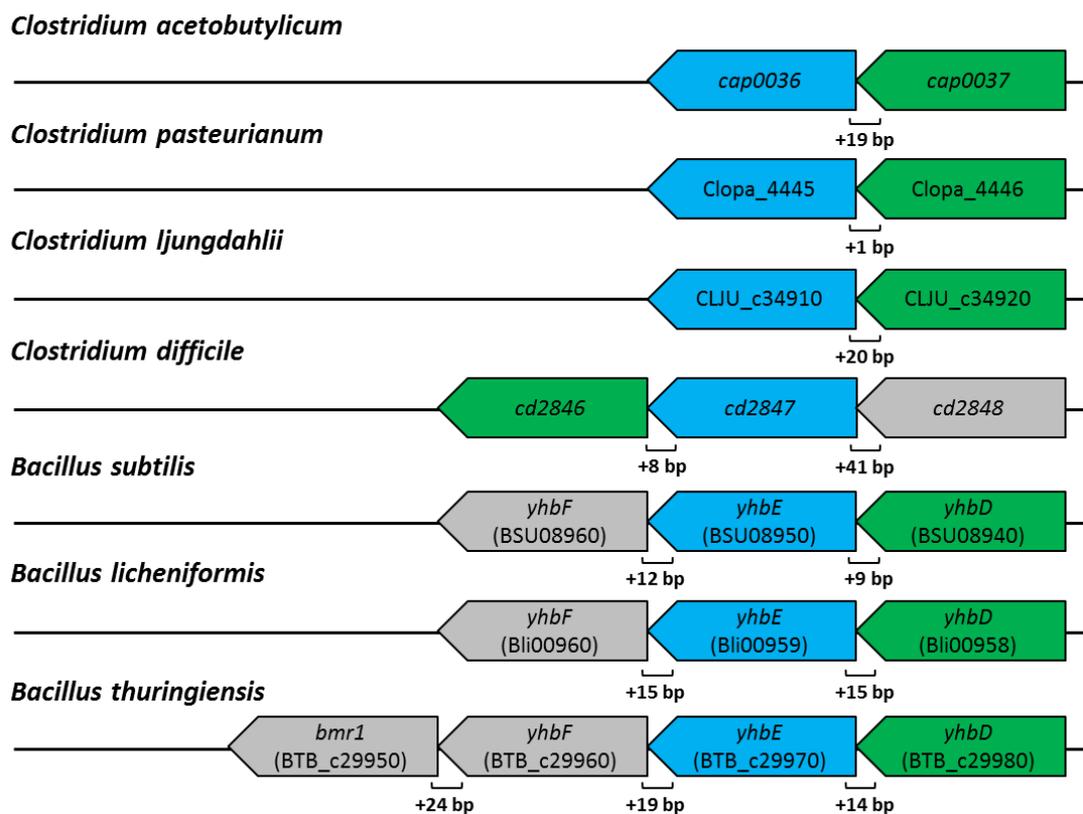


Abbildung 4.31: Schematische Darstellung des putativen Operons *cap0036-0037* in *C. acetobutylicum* und dazugehörige Orthologe aus verschiedenen Organismen der Genera *Clostridia* und *Bacilli* (Janssen 2010, mod.). Zueinander gehörende Orthologe sind farblich (blau – Orthologe von *cap0036*; grün – Orthologe von *cap0037*) hinterlegt. Weitere Gene in putativen Operonstrukturen sind grau hinterlegt. Die Größenordnungen der einzelnen Gene sind nicht maßstabsgetreu.

Putative Operonstrukturen in gleicher Genreihenfolge sind vor allem in *Bacilli*-Stämmen wie *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus* oder *B. licheniformis* nachweisbar (Janssen *et al.*, 2010). So sind CAP0036/CAP0037 z.B. homolog mit *yhbE-yhbD* (auch *ygaT-ygaS* genannt) in *B. subtilis*. Die genaue Funktion des tricistronischen Operons (*yhbD-yhbE-yhbF*) ist jedoch auch hier noch nicht geklärt (Florez *et al.*, 2009). In *B. subtilis* fungiert das YocH Protein als eine Peptidoglykan-assoziierte Zellwandhydrolyse und spielt eine wichtige Rolle während des Wachstums unter Stressbedingungen (Seibert, 2009). Interessanterweise, konnten *yhbE* und *yhbF* nach osmotischen Stress oder Kälteschock an der Promotorregion des Gens *yocH* gefunden werden. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die Transkription von CAP0036/CAP0037 als Reaktion auf Metabolitstress signifikant reguliert (Wang *et al.*, 2013), ein konkreter Zusammenhang diesbezüglich oder Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen erfolgten jedoch nicht. Insgesamt bleibt daher die Rolle der beiden Gene ungeklärt. Die eingeschränkte Verbreitung von homologen Proteinen lässt allerdings auf eine individuelle Funktion von CAP0036 und CAP0037 in *C. acetobutylicum* schließen.

Sulfat-Reduktion und Cystein-Biosynthese. Außerordentlich markant war auch das Expressionsprofil von Genen, die in *C. acetobutylicum* im Zusammenhang mit dem Sulfattransport und der stufenweisen -reduktion zu Cystein und Methionin stehen (Abbildung 3.12). Während der *pta*-negative Stamm im Zuge des acidogenen Wachstums verringerte Transkriptlevel für Gene der Cystein- und Methionin-Biosynthese aufwies, wurden die entsprechenden Gen-Cluster im Rahmen des solventogenen Wachstums der *pta*-, *adc*- und *ptb*-Mutante induziert (Tabelle 3.10, Tabelle 3.12). In der *adc/pta*-Doppel-Integrante konnten hingegen keine signifikanten Veränderungen auf der Transkriptebene nachgewiesen werden. In Anbetracht der erhöhten Konzentrationen an Butyrat in *C. acetobutylicum pta::int(80)* (3.2.1.1) sowie den durch die *ptb*-Mutante produzierten Mengen an Acetat und Butanol (3.3.1.1.2, 3.3.1.1.3) passen diese Ergebnisse zu den Beobachtungen durch Alsaker *et al.* (2010). Demnach wurden Gene des Schwefelmetabolismus in *C. acetobutylicum* bedingt durch Acetatstress verstärkt exprimiert, während Butyratstress mit einer Reprimierung einherging. Ein signifikanter Einfluss auf die Expression dieser Gene konnte bereits in mehreren mit unterschiedlichen Stressfaktoren durchgeführten Studien aufgezeigt werden (Tabelle 4.14). Besonders auffällig dabei, wie auch im Rahmen dieser Arbeit, war das Transkriptionsverhalten der Gene des Clusters CAC0102-0110 (Abbildung 3.11). Wang *et al.* (2013) postulierten, dass in *C. acetobutylicum* die Expression der am Cysteinstoffwechsel beteiligten Gene durch den Regulator CymR kontrolliert wird. Die Aktivität von CymR wird in *B. subtilis* positiv durch CysK in Abhängigkeit zur Verfügbarkeit von Cystein reguliert

(Even *et al.*, 2006; Tanous *et al.*, 2008). Basierend auf der Homologie zu CymR-regulierten Genen in *Bacillales* und *Staphylococcaceae* wurden in *C. acetobutylicum* sieben Operone mit potentiellen CymR-Bindestellen in ihren Promotorbereichen identifiziert, zu denen neben CAC2235 (*cysK*) u. a. auch der Gen-Cluster CAC0102-0110 gehört. Cysteine haben über ihre Thiolgruppen eine koordinative Funktion in Eisen-Schwefel ([FeS])-Clustern, die zu den häufigsten gebildeten enzymatischen Co-Faktoren gehören (Imlay, 2006), auszuüben (Wachtershauser, 1992). In der Zelle übernehmen FeS-Proteine eine wichtige Funktion bei Stoffwechselreaktionen des Energiehaushalts. Interessanterweise konnten Hillmann *et al.* (2009) unter Sauerstoffstress eine signifikante Induktion des Operons CAC0102-0110 beobachten, während in Gegenwart von Methylviologen, einem künstlicher Elektronencarrier mit einem Redoxpotential für das erste Reduktionsstadium ähnlich dem des Ferredoxin (Thorneley, 1974), die Gene dieses Clusters deutlich reprimiert wurden (Hönicke *et al.*, 2012). Für *C. acetobutylicum* konnte nachgewiesen werden, dass O₂ das Redoxpotential anhebt (O'Brien & Morris, 1971), während die Anwesenheit von MV mit einer Abnahme des Redoxpotentials einhergeht (Peguin *et al.*, 1994). Die gegensätzlich signifikante Expression lässt die Vermutung aufkommen, dass eventuell Parallelen zwischen dem zellulären Redoxhaushalt und dem Schwefelmetabolismus in *C. acetobutylicum* bestehen. Im Rahmen eines dynamischen „pH-shifts“ wurde der Gen-Cluster CAC0102-0110 deutlich im Zuge der Umstellung des Stoffwechsels sowie während des solventogenen Wachstums exprimiert (Grimmler *et al.*, 2011). Wie eingangs erwähnt (1.2) lassen sich in *C. acetobutylicum* während des biphasischen Gärungsstoffwechsels zwei unterschiedliche Redoxzustände definieren: (1) Neben dem aus der Glykolyse stammenden ATP wird während der Acidogenese zusätzlich Energie konserviert und die Redoxhomöostase durch die Bildung von H₂ aufrechterhalten, (2) mit dem Übergang in die Solventogenese erfolgt die Regeneration von NAD⁺ durch die Einleitung der Lösungsmittelbildung, was mit einer Verringerung der H₂-Produktion einhergeht. Aufgrund eines ansteigenden NADH/NAD⁺-Levels in der Säurephase wechselt der Stoffwechsel vom oxidativen (1) in den reduktiven (2) Redoxzustand. Der Cluster CAC0102-0110 scheint eine entscheidende Funktion im Netzwerk der an der Bildung von organischen Schwefelmetaboliten sowie am Transport von Eisen und Sulfat beteiligten Genen zu spielen, denen wiederum eine zentrale Bedeutung für den intrazellulären Redoxstatus zugeschrieben werden kann.

Tabelle 4.14: Übersicht zu Studien, in denen Gene des Cystein- Schwefel- und Methionin-Metabolismus signifikant in ihrem Transkriptionsverhalten beeinflusst wurden.

Stamm	Kultivierungsbedingungen	Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (pMSPOA)	· Batch-Kultivierung	(Alsaker <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Batch-Kultivierung · Oxidativer Stress (Begasung mit komprimierter Luft)	(Hillmann <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Batch-Kultivierung · Metabolitstress (Acetat, Butyrat, Butanol)	(Alsaker <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Batch-Kultivierung · Metabolitstress (Butanol)	(Heluane <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Kontinuierliche Kultur · Dynamischer „pH-shift“	(Grimmler <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Batch-Kultivierung · Zugabe von Methylviologen	(Hönicke <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Kontinuierliche Kultivierung · Metabolitstress (Butanol)	(Janssen <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Kontinuierliche Kultivierung · Metabolitstress (Butanol)	(Schwarz <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Batch-Kultivierung · Metabolitstress (Butanol, Butyrat)	(Wang <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	· Batch-Kultivierung · Metabolitstress (Butanol, Butyrat)	(Venkataramanan <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	· Batch-Kultivierung · Zugabe von Fufural	(Zhang & Ezeji, 2013)

4.2 Butyrat-/Butanol-negativer Stamm

Das für die 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd) kodierende *hbd*-Gen (CAC2708) ist Teil des sogenannten Butyryl-CoA-Synthese-(*bcs*)-Operons (Bennett & Rudolph, 1995; Berezina *et al.*, 2008; Boynton *et al.*, 1996; Cornillot *et al.*, 1997a) und stellt den Verzweigungspunkt zu dem sogenannten C₄-Weg dar (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011). Die im *bcs*-Operon organisierten Gene (*crt*, *bcd*, *etfA*, *etfB*, *hbd*) sind während des Gärungsstoffwechsels für die Umwandlung von Acetoacetyl-CoA zu dem C₄-Intermediat

Butyryl-CoA, dem Vorläufer von Butyrat und Butanol, verantwortlich (Abbildung 1.2). Es stellen sich somit zwei Fragen: (1) Ist es möglich, durch die Inaktivierung der Hbd die Bildung von C₄-Körpern zu unterbinden und (2) Wenn ja, ist dieser Stamm überlebensfähig. Wie durch Lehmann et al. (2011) gezeigt, können beide mit einem „ja“ beantwortet werden. *C. acetobutylicum hbd::int(69)* offenbarte zudem einen sehr auffälligen Phänotyp. So konnten im Rahmen der Fed-Batch Fermentationen bis zu 33 g/l (~715 mM) Ethanol bestimmt werden. Im Chemostaten wies der *hbd*-Stamm bereits 12 h nach Beginn der kontinuierlichen Kulturführung ~50 mM Ethanol auf. Während des *steady state* Wachstums bei pH 5,7 konnten schließlich ~122 mM Ethanol dokumentiert werden (Abbildung 3.17). Dies entsprach einer gegenüber dem Wildtyp rund 23-fach gesteigerten Produktion. Durch die Inaktivierung der Hbd wurde Butyrat als Nebenprodukt eliminiert. Wie schon bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* (3.3.1.1) scheint auch hier dies zu einer erhöhten Acetatbildung zu führen, um die Zelle mit ausreichend ATP zu versorgen (Harris et al., 2000; Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011). Während der Acidogenese stellten in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* somit Acetat und Ethanol die dominierenden Gärungsprodukte dar (Abbildung 3.17). Gleiches konnte im Zuge des solventogenen *steady state* Wachstum bei pH 4,5 beobachtet werden. So wurden ~138 mM Ethanol sowie ~37 mM Acetat im zellfreien Kulturüberstand der *hbd*-Mutante bestimmt. Die Tatsache, dass Acetat nicht reassimiliert wurde, schien mit der ausbleibenden Acetonproduktion zu korrelieren, was wiederum im Einklang mit den Beobachtungen zu den Defektmutanten des Säure- und Acetonstoffwechsels (4.1) steht. Laktat und Butanol waren zu keinem Zeitpunkt im Mediumüberstand nachweisbar.

4.2.1 Einfluss der Hbd-Inaktivierung auf die Redoxhomöostase

Die Analyse der Gärungsprodukte ergab, dass die Inaktivierung der 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd) zu einer verstärkten Bildung von Ethanol bei gleichzeitig deutlich verringerter Acetonproduktion führte (Abbildung 3.17). Eine vorangegangene Studie im Batch-Maßstab konnte für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* zudem eine gegenüber dem Wildtyp deutlich verminderte Wasserstoffproduktion nachweisen (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011). Aufgrund des fehlenden Butyrats offenbarte die *hbd*-Integrante konsequenterweise auch eine verringerte Gesamtsäureproduktion. Dieser Phänotyp gleicht dem in der Literatur als „Alkohologenese“ beschriebenen Stoffwechsel von *C. acetobutylicum*, der zudem mit einer hohen NADH-Konzentration in der Zelle assoziiert wird (Datta & Zeikus, 1985; Girbal & Soucaille, 1994; Grupe & Gottschalk, 1992; Meyer & Papoutsakis, 1989; Peguin et al., 1994; Vasconcelos et al., 1994).

Die Biosynthese von Acetaldehyd, welches im weiteren Verlauf durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase und/oder die Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2) zu Ethanol reduziert wird, kann über zwei Stoffwechselwege erfolgen: (1) oxidative Decarboxylierung von Pyruvat durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pfor) und anschließender Reduktion von Acetyl-CoA zu Acetaldehyd oder (2) oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd durch die Pyruvat-Decarboxylase (Pdc). Die während der Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ durch die Pfor entstandenen Elektronen werden auf den Elektronenakzeptor Ferredoxin (Fd) übertragen, dessen niedriges Redoxpotential die Reduktion der Protonen für die Bildung von molekularem H₂ durch die Hydrogenase ermöglicht. Es wurde postuliert, dass *C. acetobutylicum* neben der Pfor über eine Ferredoxin:NADH-Oxidoreduktase (Fnor) verfügt (Vasconcelos *et al.*, 1994). Das Enzym, dessen Gen bis heute nicht identifiziert werden konnte, soll die thermodynamisch ungünstige ($\Delta G^{\circ} = 21,2$ kJ/mol) Reduktion des Ferredoxins durch das Reduktionsäquivalent NADH katalysieren (Petitdemange *et al.*, 1976; Petitdemange *et al.*, 1977). In der Rückreaktion wird das reduzierte Fd reoxidiert und die Protonen auf NAD⁺ übertragen, was mit einem Anstieg des NADH-Gehalts in der Zelle einhergeht (Grupe & Gottschalk, 1992). In diesem Fall spricht man von einer Ferredoxin:NAD⁺-Reduktase-Aktivität (Gonzalez-Pajuelo *et al.*, 2006; Jungermann *et al.*, 1973). Es wurde vermutet, dass eine verstärkte Alkoholbildung und eine bedingt dadurch verminderte Wasserstoffsynthese auf eine erhöhte Fnor-Aktivität zurückzuführen ist (Girbal & Soucaille, 1994; Girbal *et al.*, 1995b; Vasconcelos *et al.*, 1994). Diese Reaktion ist jedoch umstritten, da sie mit einer ineffektiven Energieverwertung verbunden ist und in einer unvorteilhaften Ansammlung von NADH resultieren würde (Krauß, 2012). Eine durch den Anstieg der NADH-Verfügbarkeit bedingte dominante Alkoholbildung kann jedoch auch auf einer erhöhten glykolytischen Aktivität beruhen. So berichteten Wang *et al.* (2012) im Rahmen von O₂-Stressexperimenten von einem gesteigerten glykolytischen Fluss während der exponentiellen Wachstumsphase und einer früh einsetzenden Produktion von Butanol. Interessanterweise wurde bereits in einer früheren Studie beobachtet, dass unter O₂ die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verstärkt exprimiert wird (Hillmann *et al.*, 2008). Auch konnte bereits eine Erhöhung der GAPDH-Aktivität im Zuge des alkohologenen Stoffwechsels aufgezeigt werden (Saint-Amans *et al.*, 2001). Unter *steady state* Bedingungen bei pH 5,7 wies auch die *hbd*-Mutante eine signifikante Induktion des für GAPDH kodierende Gens CAC3657 auf (3.3.2.2.1). Daher wäre denkbar, dass es in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* zu einem Rückstau im Kohlenstofffluss gekommen ist, der wiederum zu einer Veränderung der intrazellulären

Redoxbedingungen geführt hat. Zur Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase ermöglicht der C₄-Weg zwei (Butyrat) oder vier (Butanol) Reaktionen, um NAD⁺ zu regenerieren. Bedingt durch die Inaktivierung der 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase kommt es zu einer Akkumulation der Reduktionsäquivalente (NADH + H⁺), die nun aufgrund der zellulären Redoxbalance in eine andere Reaktion eingeschleust werden müssen. Eine Möglichkeit bestünde in der L-Laktat-Dehydrogenase (*ldh*), welche die Reduktion von Pyruvat zu Laktat unter Verbrauch von NADH katalysiert. Laktat war jedoch zu keinem Zeitpunkt im zellfreien Überstand der *hbd*-Mutante nachweisbar. Auch konnte kein signifikanter Einfluss auf die Expression des *ldh*-Gens (CAC0267) detektiert werden. Da über die Synthese von Ethanol ebenfalls Reduktionsäquivalente entfernt werden können, wurde der metabolische Fluss in Richtung Ethanolproduktion gelenkt, wodurch gegenüber dem Wildtyp eine bis zu ~26-fach erhöhte Konzentration bestimmt werden konnte (Abbildung 3.17). Eine Produktion von Aceton hätte die Redoxhomöostase nicht aufrechterhalten können, da hier keine Regeneration von NAD⁺ erfolgt. Eine verringerte Wasserstoffbildung würde aus redox-stöchiometrischer Sicht mit einer erhöhten Produktion von Ethanol als konkurrierender Elektronen verbrauchender Stoffwechselfad übereinstimmen. Bereits in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Stoffwechsel durch die Verschiebung des intrazellulären NADH/NAD⁺-Verhältnis zu Gunsten von NAD(P)H „künstlich“ von der H₂-Produktion in Richtung Alkoholbildung gelenkt werden kann (Bahl *et al.*, 1986; Datta & Zeikus, 1985; Doremus *et al.*, 1985; Girbal & Soucaille, 1994; Girbal *et al.*, 1995b; Grupe & Gottschalk, 1992; Hönicke *et al.*, 2012; Hüsemann & Papoutsakis, 1989; Kim *et al.*, 1984; Meyer *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1986; Peguin & Soucaille, 1995; Saint-Amans *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2012).

4.2.2 AdhE2 verantwortlich für die Ethanolproduktion?

Wie bereits erwähnt konnten in *C. acetobutylicum* zwei paraloge Gene der Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase (*adhE1*, *adhE2*) identifiziert werden. Beide sind auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisiert, unterscheiden sich jedoch in ihrer genetischen Organisation deutlich voneinander. Während *adhE1* (CAP0162) im polycistronischen *sol*-Operon organisiert ist, bildet *adhE2* (CAP0035) ein monocistronisches Operon (Fontaine *et al.*, 2002). Proteinsequenzanalysen ergaben, dass CAP0162 und CAP0035 zueinander eine 66 %-ige Identität sowie eine 81 %-ige Ähnlichkeit aufweisen und das auch die AdhE2 sich durch eine N-terminale Aldehyd- und eine C-terminale Alkohol-Dehydrogenase-Domäne auszeichnet. Die beiden Lösungsmittel Ethanol und Butanol werden in *C. acetobutylicum* durch die

Umwandlung der Schlüsselintermediate Acetyl-CoA bzw. Butyryl-CoA in zwei reduktiven Schritten mit Hilfe von Aldehyd- und Alkohol-Dehydrogenasen produziert, wobei der NADPH-abhängigen AdhE1 und der Butanol-Dehydrogenase B (*bdhB*, CAC3299) unter solventogenen Wachstumsbedingungen eine Hauptfunktion zugeschrieben werden (Chen, 1995; Cooksley *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 1993; Gerischer & Dürre, 1992; Grimmer *et al.*, 2011; Nair *et al.*, 1994; Papoutsakis, 2008; Sauer & Dürre, 1995; Walter *et al.*, 1994). Eine Aktivität der NADH-abhängigen AdhE2 wurde hingegen in Kulturen nachgewiesen, die sich im sogenannten „alkohologenen“ Wachstum befinden (Fontaine *et al.*, 2002). Entsprechend der Definition kommt es zu einer Produktion von Butanol und Ethanol, nicht aber Aceton. Weitere Begleiterscheinungen sind eine verminderte Säure- und H₂-Bildung sowie ein erhöhtes NADH-Level wird (Datta & Zeikus, 1985; Girbal & Soucaille, 1994; Grupe & Gottschalk, 1992; Meyer & Papoutsakis, 1989; Peguin *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994). Frühere Experimente offenbarten, dass die Butanol-Dehydrogenase BdhA (CAC3298) bereits während der frühen exponentiellen Wachstumsphase exprimiert wird und das Transkriptionsmaximum erreicht sobald der pH-Wert abfällt (Feustel *et al.*, 2004; Gerischer & Dürre, 1992; Sauer & Dürre, 1995). Daher wurde der BdhA eine Rolle in der Ethanol- oder geringfügigen Butanolproduktion zugeschrieben. Anschließend beginnt die Expression von AdhE1 gefolgt von der Butanol-Dehydrogenase BdhB (CAC3299). In alkohologenen Kulturen wurde hingegen, obgleich Butanol synthetisiert wird, die Expression der entsprechenden Gene (*bdhA*, *bdhB*, *adhE1*) nicht belegt (Girbal *et al.*, 1995a). Es konnte jedoch interessanterweise eine mehr als 100-fach erhöhte Expression des für die AdhE2 kodierenden Gens CAP0035 beschrieben werden (Hönicke *et al.*, 2012), was die Vermutung aufkommen ließ, dass diesem Enzym während der Alkohologenese eine besondere Bedeutung zukommt.

Physiologisch zeichnet sich *C. acetobutylicum hbd::int(69)* durch eine signifikant gesteigerte Biosynthese von Ethanol, eine deutlich reduzierte Acetonbildung sowie eine verminderte Säure- und Wasserstoffproduktion aus. Dies lässt vermuten, dass bedingt durch die Inaktivierung der Hbd ein alkohologener Stoffwechsel eingeschlagen wurde. Ein vergleichbarer Phänotyp konnte kürzlich auch für eine Insertionsmutante des putativen Redoxregulators Rex (CAC2713) beobachtet werden (Wietzke & Bahl, 2012). Bereits in einer frühen Studie wurden AdhE1 und AdhE2 mit Aktivität für Butanol und Ethanol beschrieben (Dürre *et al.*, 1987). Enzymmessungen zeigten später, dass bei alkohologenen Kulturen NADH als Co-Enzym dient, während unter „normalen“ solventogenen Bedingungen NADPH verwendet wird (Girbal *et al.*, 1995b). Interessanterweise konnte sowohl für die Rex-

Defektmutante als auch *C. acetobutylicum hbd::int(69)* eine stärkere Adh-Aktivität mit NADH als Co-Faktor nachgewiesen werden (Lehmann, 2012; Wietzke, 2013). Vor diesem Hintergrund wurde die Vermutung aufgestellt, dass nicht die NADPH-abhängige AdhE1, sondern die NADH-abhängige AdhE2 für die deutlich erhöhte Ethanolbildung in den beiden Stämmen verantwortlich ist. Unterstützt wurde dies dadurch, dass *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 einen Anstieg in der Expression des *adhE2*-Gens (CAP0035) aufwies (Wietzke, 2013). Auch für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* konnte im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Induktion der AdhE2 detektiert werden (3.4.2). Die DNA-Microarray Analysen zu den Defekt-Mutanten im Säure- und Aceton-Stoffwechsel sprechen jedoch gegen eine Rolle der AdhE2 bei der Alkoholproduktion. Für die Stämme *pta::int(80)*, *ptb::int(87)* und *adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)* wurde eine zwei- bis dreistellig erhöhte Transkriptmenge des *adhE2*-Gens detektiert (Tabelle 3.9, Tabelle 3.11), obgleich, mit Ausnahme der *ptb*-Mutante (4.1.1.4), kein signifikanter Einfluss auf die Produktion von Ethanol- oder Butanol beobachtet werden konnte (Tabelle A16). Im Rahmen einer weiteren Studie innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die Aktivität der Hydrogenase HydA (CAC0028) unter Verwendung der Antisense-RNA Technologie reduziert (Krauß, 2012). Dies ging u.a. mit einer gesteigerten Produktion von Ethanol und Butanol einher, jedoch konnte für das *adhE2*-Gen im Zuge der durchgeführten vergleichenden Transkriptomanalysen keine Regulation detektiert werden. Einen weiteren Erklärungsansatz für die erhöhten Ethanolkonzentrationen könnte die in *C. acetobutylicum* annotierte Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) (Nölling *et al.*, 2001) liefern. Die Pdc (CAP0025) katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu CO₂ und Acetaldehyd und könnte somit maßgeblich in die Synthese von Ethanol involviert sein. Grimmer *et al.* (2011) konnten jedoch zeigen, dass CAP0025 nur während des metabolischen „shift“ von der Säure- zur Lösungsmittelphase exprimiert wird. Darüber hinaus müsste, basierend auf dieser Theorie, die Bildung von CO₂ zunehmen. Für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* und *C. acetobutylicum rex::int(95)* wurde jedoch eine um 20 % bzw. 18 % verringerte CO₂-Produktion ermittelt (Lehmann, 2012; Wietzke, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter acidogenen *steady state* Bedingungen bei pH 5,7 in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* zudem ein im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 signifikant reprimiertes Transkriptlevel für das *pdhE*-Gen bestimmt werden (3.3.2.2.1). Eine Rolle der Pdc im Zusammenhang mit der enormen Produktion von Ethanol scheint somit unwahrscheinlich. Wie ist jedoch die signifikant induzierte Expression des *adhE2*-Gens zu erklären? Denkbar wäre, dass die Expression der NADH-abhängigen Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2 auf dem genetischen Level von Rex (CAC2713)

kontrolliert wird. Die Verbindung von zellulären NADH/NAD⁺-Verhältnissen und einer Rex-vermittelten Regulation der Genexpression wurde bereits für andere Mikroorganismen beschrieben (Brekasis & Paget, 2003; Gyan *et al.*, 2006; Larsson *et al.*, 2005; Schau *et al.*, 2004; Sickmier *et al.*, 2005). Die Affinität des clostridiellen Rex-Proteins zur *adhE2*-Promotorregion konnte mittels „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) gezeigt werden (Wietzke, 2013). Demnach führt im Stamm *hbd::int(69)* die hohe NADH-Konzentration zu einer Dissoziation des Repressors von der Rex-Box (DNA-Erkennungssequenz im Promotorbereich des Zielgens) und somit zur Aktivierung der Genexpression. Dies würde auch im Einklang stehen mit der Beobachtung, dass die für die AdhE1 und AdhE2 kodierenden Gene in *C. acetobutylicum* antagonistisch exprimiert werden (Grimmler *et al.*, 2011). So wurde das *adhE2*-Gen (CAP0035) während des acidogenen Wachstums einer kontinuierlichen Kultur deutlich induziert, während das im *sol*-Operon lokalisierte *adhE1*-Gen (CAP0162) reprimiert vorlag. Im Zuge des solventogenen Wachstums war hingegen ein gegensätzliches Expressionsmuster nachweisbar. Entsprechend konnte unter *steady state* Bedingungen bei pH 4,5 in der *hbd*-Mutante für CAP0035 ein gegenüber dem Wildtyp ~61-fach induziertes Transkriptlevel bestimmt werden, während die Gene des *sol*-Operons (CAP0162-0164) deutlich reprimiert (~18,05) vorlagen. Das für die Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2 kodierende Gen ist jedoch nur eines von mehreren, für die in *C. acetobutylicum* ein potentielles Rex-Bindemotiv im Promotorbereich ermittelt werden konnte (Wang *et al.*, 2013; Wietzke, 2013). Daher stellt sich die Frage, warum in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* z.B. kein Einfluss auf das Expressionsverhalten der Laktat-Dehydrogenase (*ldh*, CAC0267) beobachtet werden konnte. Eine spezifische Bindung von Rex an die 5'UTR des *ldh*-Gens konnte mittels EMSA nachgewiesen werden (Wietzke, 2013). Erhöhte Mengen an Laktat konnten jedoch weder für die Hbd- noch die Rex-Defektmutante gemessen werden (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Wietzke & Bahl, 2012). Möglich wäre also, dass die Expression des *adhE2*-Gens nicht allein durch Rex reguliert wird. In einer kürzlich erfolgten Analyse des nativen *adhE2*-Promotorprofils konnte mittels Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystem ein signifikant verschiedener Aktivitätsverlauf für die *C. acetobutylicum*-Integrationsstämme *rex::int(95)* und *hbd::int(69)* aufgezeigt werden (Schulz, 2013). Es wurde daher vermutet, dass der *adhE2*-Promotor eventuell einer bisher unbekanntenen Regulation unterliegt. Um möglicherweise neue Hinweise bezüglich Funktion und Regulation der AdhE2 im biphasischen Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* zu erhalten, wurde eine auf dem ClosTron-System basierende Insertionsmutante erzeugt und im Rahmen dieser Arbeit eingehend analysiert. Im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten im

Batch-Maßstab (Cooksley *et al.*, 2012) offenbarte der Stamm *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* in kontinuierlicher Kultur einen veränderten Phänotyp. Während im Zuge des acidogenen *steady state* Wachstums bei pH 5,7 ein dem Wildtyp vergleichbares Fermentationsprofil detektiert werden konnte, waren unter solventogenen Wachstumsbedingungen bei pH 4,5 eine verringerte Butanol- und Ethanolproduktion nachweisbar (Abbildung 3.18). Die Synthese von Aceton wurde hingegen nicht beeinflusst. Jedoch das auffälligste Merkmal bestand darin, dass etwa 48 h nach dem „pH-shift“ ein Farbumschlag des Kulturmediums beobachtet werden konnte (Abbildung A37). Die dunkle, leicht schwarze Verfärbung sowie ein dazu etwas fauliger Geruch ließen vermuten, dass es zu einer verstärkten Produktion von Eisen(II)-sulfid kam. Unter den Genen, die in *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* bei pH 4,5 mindestens ein $\geq 3,0$ -fach erhöhtes Transkript gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 aufwiesen befanden sich interessanterweise vor allem solche, die an der Synthese von organischen Schwefelmetaboliten beteiligt sind (3.4.2.2). Für die bereits mehrfach in diesem Zusammenhang auffällig gewordenen Gene des Clusters CAC0102-110 (Abbildung 3.11) konnte gar eine bis zu ~ 302 -fach erhöhte Induktion im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle A24) bestimmt werden.

Eine Beteiligung der AdhE2 (*adhE2*, CAP0035) an der Alkoholproduktion scheint unwahrscheinlich. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde bereits die Vermutung aufgestellt, dass eventuell Parallelen zwischen dem zellulären Redoxhaushalt und dem Schwefelmetabolismus in *C. acetobutylicum* bestehen. Dabei scheinen sowohl die mit dem Sulfattransport und der stufenweisen -reduktion zu Cystein und Methionin stehenden Gene als auch das *adhE2*-Gen eine bedeutende Rolle einzunehmen. Angesichts der Tatsache, dass Gene des Schwefelmetabolismus im Zuge der Umstellung des Stoffwechsels sowie während des solventogenen Wachstum deutlich exprimiert wurden (Grimmler *et al.*, 2011), ist auch hier eine entsprechende Korrelation denkbar. In diesem Zusammenhang wäre es interessant herauszufinden, wie sich unterschiedliche Konzentrationen an Sulfat auf das Produktspektrum von *C. acetobutylicum* auswirken. Eine damit verbundene Transkriptomanalyse könnte möglicherweise auch neue Erkenntnisse zur Rolle der AdhE2 liefern.

4.3 Oxidative Verwertung von Pyruvat

Über den Embden-Myerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) wird basierend auf der Substratketten-Phosphorylierung 1 mol Glukose zu 2 mol Pyruvat umgesetzt. Neben einer möglichen Reduktion des Pyruvats zu Laktat durch die L-Laktat-Dehydrogenase (L-Ildh; EC 1.1.1.27) konnten 3 Pyruvat oxidierende Enzyme in *C. acetobutylicum* identifiziert werden. Die

Umwandlung zu 2 mol Acetyl-CoA und CO₂ durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pfor; EC 1.2.7.1) stellt dabei den Hauptabbauweg dar (Meinecke *et al.*, 1989). Dieses Enzym ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Redoxbalance, aufgrund der Elektronendistribution über Ferredoxin in der Zelle. Die bei der phosphoroklastischen Reaktion freigesetzten Elektronen reduzieren im Oxidationszustand vorliegendes Ferredoxin. Mit Hilfe der [FeFe]-Hydrogenasen HydA wird das reduzierte Ferredoxin wieder oxidiert und die Elektronen in Form von molekularem Wasserstoff (H₂) in das Außenmedium abgegeben (Jones & Woods, 1986). Mit dem „shift“ in die Solventogenese verringert sich die Aktivität der Hydrogenase HydA (Gorwa *et al.*, 1996) wodurch die H₂-Bildung nachlässt und die Elektronen in Richtung Alkoholproduktion "drücken". Den zweiten und dritten Weg, Pyruvat oxidativ zu verwerten, stellen die Pyruvat-Formiat-Lyase (Pfl; EC 2.3.1.54) bzw. die Pyruvat-Decarboxylase (Pdc; EC 4.1.1.1) dar. Beide Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit umfangreich analysiert und sollen nun Schwerpunkt des folgenden Kapitels sein.

4.3.1 Pyruvat-Formiat-Lyase

Die Pyruvat-Formiat-Lyase (Pfl) katalysiert die reversible, Coenzym-A (CoA) abhängige Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat. Zahlreiche Studien erfolgten mit *Escherichia coli* wo die Pfl ein Schlüsselenzym des fermentativen Glukosemetabolismus darstellt (Knappe & Sawers, 1990). Eine Enzymaktivität wurde in mehreren anaeroben Mikroorganismen, wie *Enterococcus faecalis* (Lindmark *et al.*, 1969), *Streptococcus mutans* (Takahashi *et al.*, 1982) und mit *C. pasteurianum*, *C. butylicum*, *C. butyricum* und *C. kluyveri* bei verschiedenen Vertretern der Gattung *Clostridia* (Thauer *et al.*, 1970; Thauer *et al.*, 1972; Weidner & Sawers, 1996; Wood & Jungermann, 1972), nachgewiesen. In *E. coli*, *E. faecalis* und *S. mutans* nimmt die Pfl über die Bereitstellung von Acetyl-CoA zur Synthese von ATP eine katabolische Funktion ein. Die physiologische Rolle des Enzyms im Metabolismus der Clostridien ist bislang jedoch unbekannt.

Für *E. coli* konnte aufgezeigt werden, dass es sich bei der Pyruvat-Formiat-Lyase um ein Radikalenzym handelt, dessen Aktivierung durch ein aktivierendes Enzym katalysiert wird (Conradt *et al.*, 1984; Frey *et al.*, 1994; Kessler & Knappe, 1996; Knappe *et al.*, 1984; Rodel *et al.*, 1988; Wagner *et al.*, 1992). In *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnten im Zuge der Genomsequenzierung zwei ORFs identifiziert werden, welche für eine putative Pyruvat-Formiat-Lyase (CAC0980) und einer zugehörigen putativen Aktivase (CAC0981) kodieren (Nölling *et al.*, 2001). Die Expression des für die Pfl kodierenden Gens (*pflB*) konnte auf Transkriptom- und Proteomebene bestätigt werden (Alsaker & Papoutsakis, 2005; Janssen *et*

al., 2010; Jones *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2010). Es konnte jedoch, obwohl *C. acetobutylicum* weder wie Enterobakterien eine Formiat-Hydrogen-Lyase besitzt, noch eine Formiat-Dehydrogenase, wie sie weit unter den Prokaryoten, Hefen und Pflanzen verbreitet ist (Tishkov & Popov, 2006), während des Wachstums bislang keine Anreicherung von Formiat im Kultivierungsmedium dieses Bakteriums beobachtet werden. Bereits vor mehr als 4 Jahrzehnten wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Pyruvat-Formiat-Lyase im Stoffwechsel der Clostridien zur Bildung von Formiat, einem Schlüsselintermediat für die Produktion von C₁-Körpern, benötigt wird und das Enzym somit eine Rolle im Anabolismus besitzt (Jungermann *et al.*, 1972; Thauer *et al.*, 1972; Wood & Jungermann, 1972). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist es möglich einen Knock-Out in der Pyruvat-Formiat-Lyase von *C. acetobutylicum* ATCC 824 durch die Zugabe von Formiat (3.5.3.1) bzw. den Purinnukleosiden Adenosin und Guanosin (3.5.3.2) zu komplementieren, wodurch eine biosynthetische Funktion dieses Enzyms bestätigt wurde. Auch im Genom von *C. thermocellum* konnten über bioinformatische Analysen eine putative Pfl sowie insgesamt vier Pfl-aktivierende Enzyme (Pfl-AE) identifiziert werden (Carere *et al.*, 2008). Interessanterweise war es in zwei Stämmen möglich, Formiat als signifikantes Fermentationsendprodukt nachzuweisen (Islam *et al.*, 2006; Islam *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 1993; Sparling *et al.*, 2006). BLAST-Analysen offenbarten jedoch, dass die putativen Proteine Pfl- und Pfl-AE von *C. thermocellum* mit entsprechenden Enzymen der Gattungen *Bacillus* und *Thermosynechococcus* eine größere Identität in der Aminosäuresequenz aufweisen als mit anderen Vertretern der Gattung *Clostridium* (Sparling *et al.*, 2006). Vergleichende Expressionsanalysen mittels DNA-Microarrays ergaben, dass in *Bacillus licheniformis* DSM13 die putative Pyruvat-Formiat-Lyase (BLi02132) und das zugehörige putative Aktivierungsenzym (BLi02131) unter fermentativen Kultivierungsbedingungen eine mehr als 8-fache Steigerung des log Expressionsverhältnisses im Vergleich zu aeroben Wachstumsbedingungen aufwiesen (Schwarzer, 2010). Dies wurde gestützt durch eine Anreicherung von Formiat im Kulturüberstand während des anaeroben Wachstums. Demnach kann, wie bereits vermutet wurde (Weidner & Sawers, 1996), die Pyruvat-Formiat-Lyase bezüglich ihrer Funktion in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass in *C. acetobutylicum* ATCC 824 durch die Pfl synthetisiertes Formiat als Quelle von Formylgruppen während der Bildung der Purinnukleotide fungiert und das Enzym somit eine Rolle im Anabolismus einnimmt. Demgegenüber steht die katabole Funktion in Form einer Bereitstellung von Acetyl-CoA zur ATP-Synthese.

Neben der Tatsache, dass die Pfl in einer aktiven oder inaktiven Form vorliegen kann, können unabhängig von der metabolischen Funktion grundlegende Gemeinsamkeiten hinsichtlich der enzymatischen Systeme beobachtet werden. Genetische Analysen verschiedener Pyruvat-Formiat-Lyasen von Clostridien zeigten, dass ihre Aminosäuresequenzen ein hohes Maß an Homologie zur Pyruvat-Formiat-Lyase von *E. coli* aufweisen (Hesslinger *et al.*, 1998; Weidner & Sawers, 1996), was durch BLAST-Analysen bestätigt werden konnte. Der Vergleich der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*, CAC0980) und dessen Aktivierungsenzym (*pflA*, CAC0981) mit den Genen b0903 (*pflB*) sowie b0902 (*pflA*) in *E. coli* K12 ergab eine Übereinstimmung von 61 % (465 / 750 AS) bzw. 43 % (103 / 238 AS). Es wurde vermutet, dass ähnlich dem in *E. coli* gegenwärtigen enzymatischen System der Aktivierungsprozess der Pyruvat-Formiat-Lyasen von Clostridien unter anderem Co^{2+} /Thiol- oder Fe^{2+} /Thiol-Komplexe sowie ein Reduktionssystem mit Flavodoxin oder Ferredoxin (Fd) als physiologische Reduktionsmittel benötigt (Thauer *et al.*, 1972; Wood & Jungermann, 1972). Interessanterweise konnte in der *pflB*-Integrante mit Hilfe der Transkriptionsanalysen (3.5.4) sowohl eine gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 signifikant erhöhte Transkription zahlreicher Gene nachgewiesen werden dessen Proteine Thiolgruppen tragen und eine Funktion im zellulären Redoxhaushalt einnehmen als auch eine signifikante Induktion von zwei (CAC0075, CAC3527) der fünf annotierten ORFs, die für putative Ferredoxine kodieren (Nölling *et al.*, 2001). Die Analyse der Microarray-Daten offenbarte zudem, dass während der stationären Wachstumsphase mit CAC3417 (~60-fach) und CAC0587 (~13-fach) zwei der vier für putative Flavodoxine kodierenden Gene (Nölling *et al.*, 2001) ein signifikant induziertes Transkriptionsmuster aufwiesen, was insgesamt eine Störung der Redoxhomöostase in der *pflB*-Mutante vermuten lässt. Alle Flavodoxine enthalten ein einzelnes, nicht kovalent gebundenes Flavinmononukleotid (FMN) (Muralidhara & Wittung-Stafshede, 2005), welches sich vom Vitamin Riboflavin (RF, Vitamin B₂) ableitet. Die Kultivierung von *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* in Flüssigkultur oder auf komplexem Festmedium ging mit einer stark gelben Verfärbung des Mediums einher (3.5.2), deren Ursache, wie über die Bestimmung des Absorptionsspektrums gezeigt werden konnte (Anhang, Abbildung A39), auf eine Akkumulation von Flavinen zurückzuführen ist. Die Vermutung, dass es sich dabei um Riboflavin handelt wurde durch die Transkriptionsanalysen bekräftigt. Sowohl während der exponentiellen (3.5.4.1) als auch der stationären Wachstumsphase (3.5.4.2) konnte in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* ein signifikant erhöhtes Expressionslevel der Gene des an der Biosynthese von Riboflavin beteiligten *ribDBAH*-Operons (CAC0590-0593) detektiert werden. Cai und Bennett (2011) berichteten

von einer Produktion von über 70 mg/l RF im Zuge einer Plasmid basierten Überexpression des *ribDBAH* Gen-Clusters in *C. acetobutylicum*. Überraschenderweise war es trotz einer Komplementierung des Knock-Outs in der Pyruvat-Formiat-Lyase (3.5.3) nicht möglich, die Akkumulation des Riboflavins zu verhindern oder zumindest zu reduzieren (Tabelle A26, Tabelle A27). Interessanterweise konnte für die *pflB*-Integrate während der stationären Wachstumsphase eine signifikant erhöhte Transkription des Gen-Clusters CAC1029-1032 nachgewiesen werden. Dieser codiert für ein putatives bakterielles Feo-Transportsystem, welches mit der Aufnahme von zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) in Verbindung steht (Andrews *et al.*, 2003; Hantke, 1987; Kammler *et al.*, 1993). Innerhalb des Feo-Systems, das ursprünglich in *E. coli* charakterisiert wurde, ist FeoB der Haupttransporter für Fe^{2+} (Cartron *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2013). Mehrfach konnte in Bakterien ein Zusammenhang zwischen der Eisenregulation und der Produktion von Flavinen aufgezeigt werden (Crossley *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 2005; Pich *et al.*, 2012; Worst *et al.*, 1998). Eine Veröffentlichung über eine Insertionsmutante eines putativen Regulators zur Eisenaufnahme in *C. acetobutylicum* (CAC1682, *fur*) bestätigte diese Verbindung (Vasileva *et al.*, 2012). Wenn der sogenannte „ferric uptake regulator“ (Fur) als ein Aktivator fungiert, ist eine Fur-Box „upstream“ des Promoters lokalisiert, während bei einer Funktion als Repressor ein Fur-Bindemotiv die Promotorregion überlappt (Delany *et al.*, 2004; Lee & Helmann, 2007). Für den Stamm *C. acetobutylicum fur::int(271)* konnte eine Akkumulation von ca. 78 mg/L RF im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Dies ließ vermuten, dass die Transkription des *ribDBAH* Gen-Clusters (CAC0590-0593), ähnlich wie die des *ribBA*-Operons in *H. pylori* (Ernst *et al.*, 2005; Pich *et al.*, 2012), durch Fur reguliert wird (Vasileva, 2014). Die Analyse der Promotorregion offenbarte jedoch keine konservierte Fur-Bindesequenz. Obwohl eine putative Fur-Box im ersten Gen des *ribDBAH*-Operons identifiziert werden konnte, erfolgt die Regulation dieses Clusters scheinbar nicht direkt durch Fur. In vielen Bakterien, wie beispielsweise *B. subtilis* (Mack *et al.*, 1998; Mironov *et al.*, 2002; Vitreschak *et al.*, 2002; Vitreschak *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2002), wird die Riboflavinbiosynthese über einen FMN-Riboswitch reguliert. Ein Riboswitch ist ein Bereich in der 5'-untranslatierten Region der mRNA. Das Binden eines Metaboliten, in dem Fall FMN, führt zu einer Konformationsänderung, die letztendlich einen Transkriptions- oder Translationsstopp bewirkt (Brantl, 2004). Bei einer transkriptionellen Kontrolle bewirkt die Bindung von FMN an den untranslatierten 5'-Bereich der mRNA die Bildung einer Terminator-Haarnadelstruktur was wiederum dazu führt, dass die RNA-Polymerase von der DNA abfällt und die mRNA nicht weiter synthetisiert wird. Bei einer translationalen Kontrolle geht die Bindung von FMN

mit der Ausbildung einer RBS(Ribosomal Binding Site)-Sequestor-Struktur einher, die das Anlagern des Ribosoms und infolgedessen die Translation der mRNA verhindert. Ist hingegen kein FMN vorhanden, kann sich eine anti-Terminator- bzw. anti-Sequestor-Struktur bilden. Es konnte für *C. acetobutylicum fur::int(271)* eine gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöhte Produktion des Flavodoxins (CAC0587) nachgewiesen werden (Vasileva *et al.*, 2012). Da FMN der Co-Faktor von CAC0587 ist (Demuez *et al.*, 2007), stellt sich die Frage, ob die Überproduktion von Flavodoxin möglicherweise zu einem erhöhtem Bedarf an FMN führte und es dadurch zu einer verstärkten Riboflavinbiosynthese kam. Unterstützt wurde diese Hypothese dadurch, dass eine auf dem Clostron-System basierende Knock-Out-Mutante des Gens CAC0587 unter Eisen-limitierenden Kultivierungsbedingungen einen Riboflavin-negativen Phänotyp offenbarte (Vasileva, 2014). Das für das Flavodoxin kodierende Gen CAC0587 wies, wie eingangs bereits erwähnt wurde, auch in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* ein gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Transkriptmenge auf. Vor diesem Hintergrund wurde die *pflB*-Mutante über einen Zeitraum von 120 h in MS-Medium (2.3.2) mit bis zu 50 µM FMN kultiviert (Anhang, Abbildung A41). Ein Unterschied bezüglich der Riboflavinproduktion konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die mitgeführte Kontrollkultur (ohne Zusatz) produzierte 77,74 µM Riboflavin. Die in Gegenwart von 10, 20 oder 50 µM FMN bestimmten Konzentrationen (85,05 µM; 94,04 µM; 146,66 µM) deuteten allerdings darauf hin, dass keine Aufnahme des extern zugeführten FMN erfolgte. Somit kann ein durch die Mutation in der Pfl hervorgerufener intrazellulärer FMN-Mangel und eine dadurch bedingt verstärkte Riboflavinbiosynthese nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund einer extremen Sensibilität gegenüber Sauerstoff gelten anaerobe Bedingungen für die enzymatische Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase als unabdingbar (Knappe *et al.*, 1969; Wagner *et al.*, 1992). In diesem Zusammenhang konnte in der *pflB*-Mutante interessanterweise für das Protein Rubredoxin (CAC2778), welches in *C. acetobutylicum* als intermediärer Elektronenüberträger zur Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und dem Aufrechterhalten des Redoxgleichgewichts dient (Hillmann *et al.*, 2009), eine signifikant erhöhte Transkription nachgewiesen werden (3.5.4.2). Wie durch Paredes *et al.* (2004) beschrieben, enthält das Genom von *C. acetobutylicum* eine Transkriptionseinheit aus mehr als 22 Genen, die im Zusammenhang mit dem Cobaltmetabolismus und der Biosynthese von Cobalamin (Vitamin B₁₂), einem Co-Faktor für eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen (Halpern, 1985; Jeter & Roth, 1987), stehen. Mehrere am Transport von Cobalt und der Cobalaminbiosynthese beteiligte Gene zeigten in *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* ein im Vergleich zum Referenzstamm ATCC 824 signifikant induziertes Expressionslevel.

Cobalamin wird als Cofaktor z.B. von der Methionin-Synthase benötigt. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Homocystein zu Methionin, wobei Methylcobalamin als Methylgruppen-Donator dient (Banerjee *et al.*, 1990). Das entstandene Methionin dient u.a. nach Umsetzung zu S-Adenosylmethionin (AdoMet) dem Pfl-aktivierenden Enzym (Pfl-AE) als Co-Substrat (Frey *et al.*, 1994). Das reduzierte Cobalamin wird mit Hilfe des aus dem Folsäurestoffwechsel stammenden N₅-Methyl-Tetrahydrofolat wieder zu Methylcobalamin umgesetzt wobei Tetrahydrofolat (THF) entsteht.

Durch die Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* konnte ein Gen (CAC3201) identifiziert werden, dass für eine Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase [EC:6.3.4.3] kodieren könnte (Nölling *et al.*, 2001). Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Umsetzung von Formiat und Tetrahydrofolat (THF) zu 10-Formyltetrahydrofolat (N¹⁰-Formyl-THF). Im Zuge der Purinbiosynthese kommt es an zwei Stellen zur Übertragung einer Formylgruppe von N¹⁰-Formyl-THF auf eine Aminogruppe des Zwischenprodukts (Benkovic, 1984) (Abbildung 4.32). Somit wird N¹⁰-Formyl-THF zur Bildung von Inosinmonophosphat (IMP) benötigt, der gemeinsamen Vorstufe von Adenosin- (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP). Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente (3.5.3.2) konnte gezeigt werden, dass in *C. acetobutylicum* ATCC 824 durch die Pyruvat-Formiat-Lyase synthetisiertes Formiat als Überträger von Formylgruppen während der Bildung der Purinnukleotide fungiert. Dies ließ vermuten, dass der ORF CAC3201 über die Produktion von 10-Formyltetrahydrofolat am Aufbau des Purinrings beteiligt ist. Daher wurde versucht, unter Verwendung des ClosTron Systems, eine entsprechende Knock-Out-Mutante zu erzeugen (Versuche in dieser Arbeit nicht gezeigt). Nach der Transformation des rekombinanten Plasmids in *C. acetobutylicum* ATCC 824 erfolgte die Selektion von Integranten auf CG-Agar, der einerseits die doppelte der normalerweise verwendeten Menge an Hefeextrakt (10 g/l) und andererseits, neben dem entsprechendem Antibiotikum, ein Gemisch aus 1 mM Adenosin sowie Guanosin enthält. Jedoch auch mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Intron-Insertionsstellen, die laut dem ClosTron „Webtool“ den höchsten „Score“ aufwiesen, war es nicht möglich, eine Knock-Out-Mutante des für die Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase kodierende Gens CAC3201 zu konstruieren. DNA-Microarray-Analysen der in CGM mit 1 mM Formiat kultivierten *pflB*-Mutante (3.5.4) offenbarten, dass weder während der exponentiellen noch der stationären Wachstumsphase die Transkription von CAC3201 beeinflusst wurde. Somit könnte es sich um ein konstitutiv exprimiertes Gen zu handeln, das im Metabolismus von *C. acetobutylicum* möglicherweise zusätzliche Funktionen einnimmt.

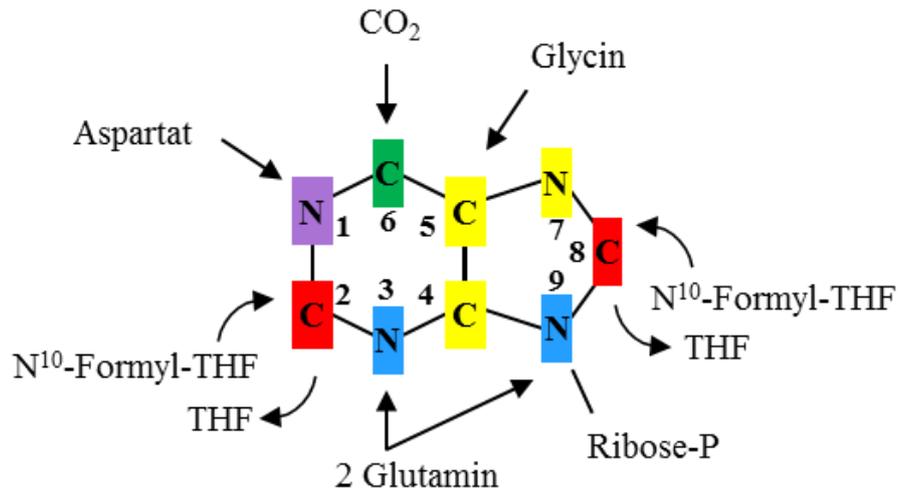


Abbildung 4.32: Herkunft der Purin-Ringatome. Gezeigt ist ein Purinkern bestehend aus 5 Kohlenstoff- und 4 Stickstoffatomen. Der Kohlenstoff stammt aus Glycin, 2 Formylresten aus 2 10-Formyltetrahydrofolat (N¹⁰-Formyl-THF) und 1 Kohlendioxid. Der Stickstoff stammt aus den Aminosäuren Glycin, Glutamin und Aspartat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bereits vor mehr als 40 Jahren von Thauer und dessen Kollegen vermutete biosynthetische Rolle der Pyruvat-Formiat-Lyase im Stoffwechsel von Clostridien (Thauer *et al.*, 1970; Thauer *et al.*, 1972; Wood & Jungermann, 1972) durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Die Abwesenheit einer funktionsfähigen Pyruvat-Formiat-Lyase in *C. acetobutylicum* ging mit einer erhöhten Expression von Genen einher, die in die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts, die Riboflavinbiosynthese, in den Eisenmetabolismus und die oxidative Stressantwort involviert sind. Die 3 letztgenannten Kategorien wurden bereits in verschiedenen Spezies, wie *E. coli*, *H. pylori* und *Azotobacter vinelandii*, als anscheinend gemeinsam reguliert beschrieben (Alsaker *et al.*, 2010). Die durchgeführten Transkriptionsanalysen zeigten somit, dass unabhängig davon, ob die Pfl in einem Organismus eine anabole oder katabole Funktion einnimmt, grundlegende Gemeinsamkeiten im Aktivierungsprozess bestehen.

4.3.2 Pyruvat-Decarboxylase

C. acetobutylicum ist bisher der einzige sequenzierte Vertreter der Gattung *Clostridium* der über ein Gen verfügt, das für eine Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) kodiert (Grimmler *et al.*, 2011). Die Pdc katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu CO₂ und Acetaldehyd (Abbildung 1.2) und scheint eine wichtige Aufgabe in der Umstellung des fermentativen Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* einzunehmen. So konnten Grimmler *et al.* (2011) zeigen, dass das auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisierte Gen der Pdc (*pdc*, CAP0025) lediglich während des Transition vom acidogenen zum solventogenen Metabolismus induziert war. Vor dem

Hintergrund, dass relativ wenig über die Physiologie des metabolischen „shift“ zur Lösungsmittelbildung bekannt ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine auf dem ClosTron-System (Heap *et al.*, 2007) basierende Insertionsmutante des *pdv*-Gens erzeugt (3.6.1).

Die Charakterisierung des Wachstums und der Produktbildung von *C. acetobutylicum pdv::int(843)* erfolgte in einer kontinuierlichen Phosphat-limitierten Kultur. Dabei offenbarte die *pdv*-Integrante einen sehr interessanten Phänotyp im Zuge der Induktion der Solventogenese. Zunächst wurde ein deutlicher Anstieg der Butanolkonzentration bis auf ~34 mM detektiert. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte jedoch dann ein markanter Einbruch in der Synthese dieses Lösungsmittels (~17 mM) nachgewiesen werden (Abbildung 3.28). Am Ende der kontinuierlichen Kultivierung (252 h) wies die *pdv*-Mutante mit ~39 mM Butanol einen gegenüber dem Wildtyp vergleichbaren Titer auf. Es stellte sich somit die Frage, wie der deutliche Rückgang in der Butanolproduktion erklärt werden kann. Einen möglichen Erklärungsansatz lieferten die vergleichenden Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays (2.10). Unter den Genen mit einer signifikant auf der Transkriptebene verstärkten Expression in *C. acetobutylicum pdv::int(843)* während des solventogenen Wachstums (pH 4,5) befand sich u. a. das auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisierte putative Operon CAP0141-0146. Die Gene CAP0141 (*mbhs*) und CAP0142 (*mbhl*) kodieren für die beiden Untereinheiten der putativen [NiFe]-Hydrogenase HupSL (Nölling *et al.*, 2001) und das Gen CAP0143 (~5,1-fach) für ein als „Hydrogenase maturation protease delta subunit, HyaD-like“ annotiertes Protein. Auch für das Gen CAC0808 (*hybG*) (~4-fach), das ebenso für ein Hydrogenase-Maturationsprotein kodiert, konnte in der *pdv*-Integrante ein gegenüber dem Wildtyp erhöhtes Expressionslevel nachgewiesen werden.

Maturationsproteine sind spezifische Enzyme, die an der Bildung des aktiven Zentrums der Hydrogenasen beteiligt sind und mit diesen co-exprimiert werden (Blokesch *et al.*, 2002; Blokesch *et al.*, 2004; Drapal & Bock, 1998; King *et al.*, 2006; Lutz *et al.*, 1991; Posewitz *et al.*, 2004). Hydrogenasen katalysieren die reversible Reaktion von zwei Protonen mit zwei Elektronen zu molekularem Wasserstoff (H₂). Während mit der H₂-Produktion überschüssige Reduktionsäquivalente oxidiert und die Elektronenüberträger regeneriert werden können, ermöglicht die H₂-Oxidation hingegen dem Organismus molekularen Wasserstoff als Elektronenquelle zu verwenden (Bowien & Schlegel, 1981; Gray & Gest, 1965). Anhand des metallischen Co-Faktors im aktiven Zentrum können die folgenden Klassen von Hydrogenasen unterschieden werden: (1) [Fe]-Hydrogenasen, (2) [FeFe]-Hydrogenasen und (3) [NiFe]-Hydrogenasen (Vignais & Colbeau, 2004). Das aktive Zentrum der [Fe]-

Hydrogenasen, die ausschließlich in methanogenen Archaeobakterien vorkommen, besteht aus einem Fe-Atom, welches durch zwei CO- und einen Pyridinolliganden sowie ein Cystein koordiniert ist (Shima & Thauer, 2007; Shima *et al.*, 2008; Zirngibl *et al.*, 1990). Sie weisen keine strukturellen Homologien zu [FeFe]-Hydrogenasen und [NiFe]-Hydrogenasen auf (Thauer *et al.*, 1996). Die aktiven Zentren der [FeFe]-Hydrogenasen und [NiFe]-Hydrogenasen sind durch ihre dimetallische Struktur und die Koordination der Fe-Atome mit CO- und CN-Liganden vergleichbar (Nicolet *et al.*, 2000). Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch in der katalytischen Aktivität. Während die physiologische Rolle der meisten [FeFe]-Hydrogenasen die Produktion von molekularem H₂ ist, dienen [NiFe]-Hydrogenasen vor allem der Wasserstoffoxidation (Adams *et al.*, 1980; Adams & Stiefel, 1998; Albracht, 1994). Mit HydA und HydA2 besitzt *C. acetobutylicum* zwei [FeFe]-haltige Hydrogenasen, die von den chromosomal gelegenen Genen CAC0028 bzw. CAC3230 kodiert werden (Nölling *et al.*, 2001). Für HydA konnte eine spezifische Aktivität von 10 µmol H₂ · min⁻¹ · mg⁻¹ gemessen werden (Girbal *et al.*, 2005). Diese ist fast 10-mal höher als die von HydA2, sodass die Produktion von molekularem Wasserstoff wahrscheinlich hauptsächlich durch HydA erfolgt (Demuez *et al.*, 2007; Gorwa *et al.*, 1996). Des Weiteren verfügt *C. acetobutylicum* mit HupSL über eine [NiFe]-Hydrogenase, die vermutlich für den H₂-Aufnahme der Zelle verantwortlich ist (Guerrini *et al.*, 2008).

C. acetobutylicum fehlt die Fähigkeit, seine Elektronen über eine Membran-gebundene Elektronentransportkette auf terminale Elektronenakzeptoren (Nitrat, Sauerstoff, Sulfat) zu übertragen und dadurch Energie zu generieren. Daher muss der Organismus seine Elektronenträger wie reduziertes Ferredoxin oder NADH über die Produktion von H₂ und reduzierten Endprodukten (Butanol, Ethanol) regenerieren. Zwischen der Produktion von Wasserstoff und den reduzierten Lösungsmitteln besteht ein Konkurrenzverhältnis um den Elektronenfluss (Kim *et al.*, 1984). Somit stellt die Hydrogenase einen interessanten Manipulationspunkt dar, um durch eine Verringerung der Wasserstoffbildung mehr Reduktionskraft für die Alkoholbildung zur Verfügung zu stellen. So konnte für *C. acetobutylicum* bspw. gezeigt werden, dass durch eine verminderte Rührung des Kulturmediums und einen erhöhten H₂-Partialdruck die Butanolausbeute, wenn auch nur geringfügig (0,07 %), gesteigert wird (Doremus *et al.*, 1985). Unter Eisen-limitierenden Kultivierungsbedingungen wurde das Verhältnis von Butanol zu Aceton bis auf 11:1 angehoben (Junelles *et al.*, 1988) und durch Begasung mit Kohlenmonoxid (CO), welches reversibel an die Hydrogenase bindet und dadurch das aktive Zentrum blockiert, die Butanolausbeute um bis zu 39 % erhöht (Datta & Zeikus, 1985; Kim *et al.*, 1984). Ähnliche Beobachtungen waren auch in Gegenwart von

Neutral-Rot und Methylviologen, sogenannten artifiziellen Elektronenträgern, möglich (Chauvatcharin *et al.*, 1998; Girbal *et al.*, 1995b; Hönicke *et al.*, 2012; Peguin *et al.*, 1994; Peguin & Soucaille, 1996; Rao & Mutharasan, 1987). Dadurch dass die Aktivität der Hydrogenase HydA reduziert wurde, stieg die NADH-Verfügbarkeit der Zelle wodurch NADH-abhängige Reaktionen der Solventogenese begünstigt wurden. Einen Einfluss auf den NADH-Gehalt und somit auf die Lösungsmittelproduktion konnte auch durch eine Veränderung der oxidativen Hydrogenaseaktivität aufgezeigt werden. Nakayama *et al.* (2008) berichtete von einer deutlich reduzierten H₂-Wiederaufnahme, die mit einer gleichzeitig geringeren Butanolproduktion einherging. Im Rahmen dieser Studie wurde die Expression der *hupCBA*-Gene in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* mittels Antisense-RNA Technologie reprimiert. Dadurch kam es zu einem Anstieg des H₂-Gehalts, wodurch die Butanolkonzentration, bedingt durch den verminderten NADH-Gehalt, abnahm.

Im Zuge der Acidogenese generiert *Clostridium acetobutylicum* seine Energie über Substratketten-Phosphorylierung. Die angehäuften Reduktionsäquivalente wie reduziertes Ferredoxin werden in Form von molekularem H₂ mit Hilfe der Hydrogenase HydA entfernt und dadurch regeneriert. Die Aktivität der Hydrogenase HydA nimmt mit der Umstellung des Stoffwechsels von der Acidogenese zur Solventogenese ab (Gorwa *et al.*, 1996) und die Regeneration der Reduktionsäquivalente wird mit der Produktion der reduzierten Endprodukte Butanol und Ethanol gewährleistet. Im Rahmen einer weiteren Studie innerhalb der Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe der Antisense-RNA Technologie die Enzymmenge der Hydrogenase HydA auf Translationsebene reduziert wodurch der Elektronenfluss auf Kosten der H₂-Produktion in Richtung der reduzierten Endprodukte gelenkt und die Solventogenese induziert wurde (Krauß, 2012). So konnte in den Stämmen mit reduzierter H₂-Produktion eine signifikante Steigerung der Lösungsmittelkonzentration nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass sich durch die Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität reduziertes Ferredoxin anhäuft wodurch die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase vermindert abläuft. In diesem Zusammenhang stellte sich jedoch die Frage, wie reduziertes Ferredoxin die NADH-abhängigen Reaktionen der Solventogenese begünstigen kann. Einen Erklärungsansatz lieferte die FAD/FMN-enthaltende Dehydrogenase mit den α - und β -Untereinheiten eines Elektronen-übertragenden Flavoproteins (CAC2542-CAC2544), ein Gen-Cluster der im Zuge von Transkriptionsanalysen eine signifikant verstärkte Expression zeigte. So wäre es nach Krauß (2012) denkbar, dass je nach Verfügbarkeit und Menge an reduziertem Ferredoxin die Reduktion von NAD⁺ mit Hilfe der Dehydrogenase und den EtfAB-Komponenten erfolgt wodurch der NADH-Gehalt der Zelle

zunimmt. Das reduzierte Ferredoxin könnte mit einer Art Kontroll- oder Regulationssystem interagieren und die Dehydrogenase an die Redoxkraft der Zelle anpassen.

Möglicherweise besteht die Funktion der Pdc in *C. acetobutylicum* darin, während des metabolischen „shifts“ den Kohlenstofffluss durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu verringern wodurch weniger reduziertes Ferredoxin, welches mit der Hydrogenase HydA interagieren kann, entsteht. Die daraus resultierende verminderte H₂-Produktion verschiebt den Elektronenfluss in Richtung der Lösungsmittelbildung und die regenerierten Elektronenakzeptoren (NAD⁺) können der Glykolyse wieder zugeführt werden. Eine in *C. acetobutylicum* lediglich während der Transition von der Acidogenese zur Solventogenese signifikant induzierte Expression des *pdc*-Gens (CAP0025) (Grimmler *et al.*, 2011) unterstützt diese Vermutung. Erfolgt im Zuge „shifts“ keine zusätzliche Spaltung von Pyruvat zu CO₂ und Acetaldehyd wird die Aktivität der Hydrogenase HydA nicht verringert, was zur Folge hat, dass überschüssige Elektronen weiterhin in Form von H₂ ins Außenmedium abgegeben werden. Verfügbarkeit und Menge des reduzierten Ferredoxins bleiben „aus Sicht“ des durch Krauß (2012) postulierten Regulationssystem unverändert. Da die Lösungsmittelbildung u.a. von der intrazellulären NADH-Verfügbarkeit der Zelle abhängig ist konnte für *C. acetobutylicum pdc::int(843)* ein Rückgang der Alkoholbiosynthese beobachtet werden konnte (Abbildung 3.28). Dem scheint *C. acetobutylicum*, wie den Ergebnissen der DNA-Microarray Analysen entnommen werden kann, mit einer verstärkten Expression der [NiFe]-Hydrogenase HupSL entgegen zu wirken. Über die Aufnahme von molekularem Wasserstoff aus dem Außenmedium ($\text{H}_2 \rightarrow 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$) wird dem Organismus so genügend NADH + H⁺ für die Reduktion der Intermediate bei der Produktion von Butanol (4 NADH + 4 H⁺) und Ethanol (2 NADH + 2H⁺) zu Verfügung gestellt. Dies würde erklären, warum die *pdc*-Integrante am Ende der kontinuierlichen Kultivierung (252 h) eine gegenüber dem Wildtyp vergleichbare Lösungsmittelkonzentration aufwies (Abbildung 3.28).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass der Pyruvat-Decarboxylase eine wichtige Aufgabe im Wechsel des fermentativen Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* ATCC 824 zukommt. Eine Möglichkeit der hier aufgestellten Theorie nachzugehen wäre eine Bestimmung der Gesamtmenge der produzierten Gase (CO₂, H₂). Auf diese Weise könnte der Einfluss einer inaktiven Pdc auf die Aktivität der Hydrogenasen und folglich der H₂-Produktion in *C. acetobutylicum pdc::int(843)* analysiert werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt neun durch ClosTron-basierte Mutagenese erhaltene Insertionsmutanten von *C. acetobutylicum* ATCC 824 einer umfangreichen Charakterisierung unterzogen. Für alle im Batch-Fermentationsmaßstab und/oder in kontinuierlicher Kultur fermentierten Stämme erfolgte eine globale Analyse des Transkriptoms unter Verwendung der DNA-Microarray-Technologie.

Für eine Analyse des Acetat- und Aceton-Stoffwechsels wurden Stämme mit einer inaktivierten Phosphotransacetylase (Pta), einer deletierten Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) sowie eine Zweifachmutante mit Defekt in beiden genannten Enzyme (Adc/Pta) verwendet. Dabei konnte einerseits die Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase- (CtfAB) und Adc-abhängige Reassimilation von Acetat nachgewiesen werden und andererseits, dass die Wiederaufnahme von Butyrat in *C. acetobutylicum* ATCC 824 nicht mit der Acetonproduktion verbunden ist. Die Auswirkungen eines Defekts im Butyrat-Stoffwechsel wurden unter Verwendung des Phosphotransbutyrylase (Ptb)-negativen Stamms *C. acetobutylicum ptb::int(87)* analysiert. Dabei offenbarte die Knock-Out-Mutante in einem Phosphat-limitierten Chemostaten ein Produktspektrum mit einigen Gemeinsamkeiten aber auch wesentlichen Unterschieden gegenüber einer Kultivierung im Batch-Fermentationsmaßstab. Besonders bemerkenswert waren die deutliche Butanolproduktion während des acidogenen Wachstums bei pH 5,7 sowie der Nachweis, dass *C. acetobutylicum* ungeachtet einer Ptb-Inaktivierung in der Lage ist extern zugeführtes Butyrat wieder aufzunehmen. Die Reassimilation von Butyrat erfolgt in *C. acetobutylicum* unabhängig vom *ptb*-Gen.

Obleich durch Inaktivierung der 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd) der komplette C₄-Stoffwechselweg des Gärungsstoffwechsels ausgeschaltet wird, ist eine entsprechende Insertionsmutante lebensfähig. In einem Phosphat-limitierten Chemostaten konnten für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* sowohl während dem acidogenen (pH 5,7) als auch dem solventogenen (pH 4,5) Wachstum Acetat und Ethanol als die dominierenden Fermentationsprodukte bestimmt werden. Dabei waren für die *hbd*-Integrierte bis zu ~137 mM Ethanol nachweisbar, eine im Vergleich zum Wildtyp etwa 17-fach höhere Konzentration.

DNA-Microarray Analysen zu den Defekt-Mutanten im Säure- und Aceton-Stoffwechsel sprechen gegen eine Rolle der AdhE2 bei der Alkoholproduktion. Die Expression des *adhE2*-Gens (CAP0035) wird möglicherweise nicht allein durch den Redoxsensor Rex (CAC2713)

reguliert. Für *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* konnte auf Basis kontinuierlicher Kultivierungen ein gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 signifikant erhöhtes Transkriptlevel vor allem für solche Gene nachgewiesen werden, die mit dem Sulfattransport und der stufenweisen -reduktion zu Cystein und Methionin im Zusammenhang stehen. Insbesondere der Cluster CAC0102-0110 scheint eine entscheidende Funktion im Netzwerk der an der Bildung von organischen Schwefelmetaboliten sowie am Transport von Eisen und Sulfat beteiligten Gene zu spielen, denen wiederum, vermutlich eine zentrale Bedeutung für den intrazellulären Redoxstatus zugeschrieben werden kann.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit erfolgte weiterhin die physiologische Charakterisierung von zwei Pyruvat oxidierenden Enzymen in *C. acetobutylicum* ATCC 824. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (Pfl) synthetisiertes Formiat als Überträger von Formylgruppen während der Bildung der Purinnukleotide fungiert und das Enzym somit eine Rolle im Anabolismus einnimmt. Für *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* offenbarten Transkriptionsanalysen, dass die Abwesenheit einer funktionsfähigen Pfl mit einer erhöhten Expression von Genen einhergeht, die in die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts, die Riboflavinbiosynthese, in den Eisenmetabolismus und die oxidative Stressantwort involviert sind. Somit bestehen unabhängig davon, ob die Pyruvat-Formiat-Lyase in einem Organismus eine anabole oder katabole Funktion einnimmt, grundlegende Gemeinsamkeiten im Aktivierungsprozess. Die Funktion der Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) in *C. acetobutylicum* ATCC 824 besteht möglicherweise darin, während des metabolischen „shifts“ von der Acidogenese zur Solventogenese den Kohlenstofffluss von Pyruvat durch die Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pfor) verringern und somit eine Reduzierung der Hydrogenase (HydA)-Aktivität zu gewährleisten. Die erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Pdc in *C. acetobutylicum* nicht für die Ethanolbildung verantwortlich ist.

5. Summary

In this work a comprehensive physiological characterization of altogether 9 ClosTron-mediated knock-out mutants of *C. acetobutylicum* ATCC 824 was performed. Batch fermentations and/or pH-controlled phosphate-limited chemostat culture experiments were conducted followed by comparative transcriptomic analyses using DNA microarray technology.

For the study of the acetate and acetone metabolism mutants with an inactivated phosphotransacetylase (Pta), a deleted acetoacetate decarboxylase (Adc) and an *adc/pta* double knock-out mutant were used. On the one hand it was possible to verify the acetoacetyl-CoA:acyl-CoA transferase (CtfAB) and Adc-dependent re-assimilation of acetate and on the other hand it was shown that in *C. acetobutylicum* butyrate re-uptake is not related to acetone production. The impact of a defect in the butyrate metabolism was analyzed by a phosphotransbutyrylase-(Ptb)-negative strain *C. acetobutylicum ptb::int(87)*. During cultivation in a phosphate-limited chemostat this knock-out mutant exhibited a very interesting product pattern with major differences to the batch cultures. The most notable finding was that the *ptb* mutant produced significant quantities of butanol during acidogenic growth at pH 5.7. The consumption of added butyrate indicated that butyrate uptake is independent of the *ptb* gene in *C. acetobutylicum*.

Although disruption of the 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (Hbd)-encoding gene leads to the inactivation of the entire butyrate/butanol (C₄) metabolic pathway in *C. acetobutylicum* it is possible to cultivate a corresponding knock-out mutant in a phosphate-limited chemostat. During both, acidogenic (pH 5.7) and solventogenic (pH 4.5) growth acetate and ethanol were determined as the main fermentation products of *C. acetobutylicum hbd::int(69)*. Up to ~137 mM ethanol were detected for the *hbd*-mutant, an approximately 17-fold higher concentration compared to the wild type strain.

The genome-wide DNA microarray analyses of mutants of *C. acetobutylicum* with defects in the acid and acetone biosynthetic pathways contradict the role of the AdhE2 in alcohol production. The expression of the *adhE2*-gene (CAP0035) is possibly not regulated solely by the redox-sensing transcriptional repressor Rex (CAC2713). In the *adhE2*-negative mutant *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* especially genes related to sulfate assimilation and gradual reduction to cysteine and methionine showed an increased transcript level compared to the wild type strain ATCC 824. Particularly the large gene cluster CAC0102-0110 seems to play an essential role in the network of genes involved in the synthesis of organic sulfur

metabolites as well as the transport of iron and sulfate, which in turn are presumably of central importance for the cellular redox state.

Furthermore, two pyruvate oxidizing enzymes in *C. acetobutylicum* ATCC 824 were analyzed within the present work. It was possible to prove that formate synthesized by the pyruvate-formate-lyase (Pfl) acts as a donor of formyl groups for the syntheses of the purine nucleotides and thus the enzyme has an anabolic function. Transcriptional analyses of *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* showed that the absence of a functional Pfl leads to the enhanced expression of genes involved in cellular redox balance, riboflavin biosynthesis, iron metabolism, and oxidative-stress response. Hence, there are fundamental commonalities in the activation process, regardless whether the Pfl has a function in the organism's anabolism or catabolism. In *C. acetobutylicum* ATCC 824 the function of the pyruvate decarboxylase (Pdc) is probably the reduction of the metabolic flux of pyruvate through the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (Pfor) reaction during the metabolic from acidogenesis to solventogenesis and thus ensures a decrease of the hydrogenase (HydA)-activity. The experiments in this work revealed that the Pdc in *C. acetobutylicum* is not responsible for ethanol production.

6. Publikationen

Hönicke D., Liebl W., Ehrenreich A. (2015) The physiological role of pyruvate-formate-lyase in *Clostridium acetobutylicum*. Microbiology (in preparation)

Hönicke D., Lütke-Eversloh T., Ziyong L., Lehmann D., Liebl W., Ehrenreich A. (2014) Chemostat cultivation and transcriptional analyses of *Clostridium acetobutylicum* mutants with defects in the acid and acetone biosynthetic pathways. Applied Microbiology and Biotechnology 2014 Dec; 98(23):9777-94. Epub 2014 Oct 4.

Vasileva D., Janssen H., **Hönicke D.**, Ehrenreich A., Bahl H. (2012) Effect of iron limitation and *fur* gene inactivation on the transcriptional profile of the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. Microbiology 2012 Jul; 158(Pt 7):1918-29. Epub 2012 May 3.

Lehmann D., **Hönicke D.**, Ehrenreich A., Schmidt M., Weuster-Botz D., Bahl H., Lütke-Eversloh T. (2012) Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. Applied Microbiology and Biotechnology 2012 May; 94(3):743-54. Epub 2012 Jan 14.

Hönicke D., Janssen H., Grimmmler C., Ehrenreich A., Lütke-Eversloh T. (2012) Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol:acetone ratios. New Biotechnology 2012 May; 29(4):485-93. Epub 2012 Jan 21.

7. Literaturverzeichnis

Abraham, L. J. & Rood, J. I. (1987). Identification of Tn4451 and Tn4452, chloramphenicol resistance transposons from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **169**, 1579-1584.

Adams, M. W., Mortenson, L. E. & Chen, J. S. (1980). Hydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **594**, 105-176.

Adams, M. W. & Stiefel, E. I. (1998). Biological hydrogen production: not so elementary. *Science* **282**, 1842-1843.

Albracht, S. P. (1994). Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim Biophys Acta* **1188**, 167-204.

Alsaker, K. V., Spitzer, T. R. & Papoutsakis, E. T. (2004). Transcriptional analysis of spo0A overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the cell's response to butanol stress. *J Bacteriol* **186**, 1959-1971.

Alsaker, K. V. & Papoutsakis, E. T. (2005). Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **187**, 7103-7118.

Alsaker, K. V., Paredes, C. & Papoutsakis, E. T. (2010). Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Bioeng* **105**, 1131-1147.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

Amador-Noguez, D., Brasg, I. A., Feng, X. J., Roquet, N. & Rabinowitz, J. D. (2011). Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 7984-7997.

Andersch, W., Bahl, H. & Gottschalk, G. (1982). Acetone-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in an ammonium-limited chemostat at low pH values. *Biotechnol Lett* **4**, 29-32.

Andersch, W., Bahl, H. & Gottschalk, G. (1983). Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**, 327-332.

Andre, G., Even, S., Putzer, H., Burguiere, P., Croux, C., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. & Soutourina, O. (2008). S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium acetobutylicum*. *Nucleic Acids Res* **36**, 5955-5969.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.

- Babb, B. L., Collett, H. J., Reid, S. J. & Woods, D. R. (1993).** Transposon mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum* P262: isolation and characterization of solvent deficient and metronidazole resistant mutants. *FEMS Microbiology Letters* **114**, 348-343.
- Baer, S. H., Blaschek, H. P. & Smith, T. L. (1987).** Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2854-2861.
- Baer, S. H., Bryant, D. L. & Blaschek, H. P. (1989).** Electron Spin Resonance Analysis of the Effect of Butanol on the Membrane Fluidity of Intact Cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2729-2731.
- Bahl, H., Andersch, W., Braun, K. & Gottschalk, G. (1982a).** Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **14**, 17-20.
- Bahl, H., Andersch, W. & Gottschalk, G. (1982b).** Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **15**, 201-205.
- Bahl, H. & Gottschalk, G. (1984).** Parameters affecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Biotechnol Bioeng Symp* **14**, 215-223.
- Bahl, H., Gottwald, M., Kuhn, A., Rale, V., Andersch, W. & Gottschalk, G. (1986).** Nutritional Factors Affecting the Ratio of Solvents Produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **52**, 169-172.
- Bahl, H. & Gottschalk, G. (1988).** Microbial production of butanol/acetone. In: *H-J Rehm, G Reed (Hrsg), Biotechnology, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim Vol. 6b*, 1-30.
- Bailey, J. E. (1991).** Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-1675.
- Banerjee, R. V., Frasca, V., Ballou, D. P. & Matthews, R. G. (1990).** Participation of cob(I) alamin in the reaction catalyzed by methionine synthase from *Escherichia coli*: a steady-state and rapid reaction kinetic analysis. *Biochemistry* **29**, 11101-11109.
- Benkovic, S. J. (1984).** The transformylase enzymes in de novo purine biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* **9**, 320-322.
- Bennett, G. N. & Rudolph, F. B. (1995).** The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Reviews* **17**, 241-249.
- Bentley, R. (1990).** The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **25**, 307-384.
- Berezina, O. V., Sineokii, S. P., Velikodvorskaia, G. A., Schwarz, W. & Zverlov, V. V. (2008).** [Extracellular glycosyl hydrolase activity of the clostridia producing acetone, butanol, and ethanol]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **44**, 49-55.

- Bertram, J. & Dürre, P. (1989).** Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Archives of Microbiology* **151**, 551-557.
- Bertram, J., Kuhn, A. & Dürre, P. (1990).** Tn916-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in regulation of solvent formation. *Archives of Microbiology* **153**, 373-377.
- Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S. & Bock, A. (2002).** Metal insertion into NiFe-hydrogenases. *Biochem Soc Trans* **30**, 674-680.
- Blokesch, M., Albracht, S. P., Matzanke, B. F., Drapal, N. M., Jacobi, A. & Bock, A. (2004).** The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *J Mol Biol* **344**, 155-167.
- Bowien, B. & Schlegel, H. G. (1981).** Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol* **35**, 405-452.
- Bowles, L. K. & Ellefson, W. L. (1985).** Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **50**, 1165-1170.
- Boyd, J. M., Ellsworth, H. & Ensign, S. A. (2004).** Bacterial acetone carboxylase is a manganese-dependent metalloenzyme. *J Biol Chem* **279**, 46644-46651.
- Boynton, Z. L., Bennett, G. N. & Rudolph, F. B. (1996).** Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2758-2766.
- Brantl, S. (2004).** Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. *Trends Microbiol* **12**, 473-475.
- Brekasis, D. & Paget, M. S. (2003).** A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J* **22**, 4856-4865.
- Bunday Z., Linden, J. C. & Karim, M. N. (1989).** Improved acetone-butanol fermentation analysis using subambient HPLC column temperature. *Enzyme Microbial Technol* **12**, 24-27.
- Cai, X. & Bennett, G. N. (2011).** Improving the *Clostridium acetobutylicum* butanol fermentation by engineering the strain for co-production of riboflavin. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**, 1013-1025.
- Carere, C. R., Kalia, V., Sparling, R., Cicek, N. & Levin, D. B. (2008).** Pyruvate catabolism and hydrogen synthesis pathway genes of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Indian journal of microbiology* **48**, 252-266.
- Cartron, M. L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C. J. & Andrews, S. C. (2006).** Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **19**, 143-157.

- Cary, J. W., Petersen, D. J., Papoutsakis, E. T. & Bennett, G. N. (1988).** Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* phosphotransbutyrylase and butyrate kinase genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**, 4613-4618.
- Chauvatcharin, S., Siripatana, C., Seki, T., Takagi, M. & Yoshida, T. (1998).** Metabolism analysis and on-line physiological state diagnosis of acetone-butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* **58**, 561-571.
- Chen, J. S. (1995).** Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. *FEMS Microbiol Rev* **17**, 263-273.
- Chester, N. & Marshak, D. R. (1993).** Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **209**, 284-290.
- Clark, S. W., Bennett, G. N. & Rudolph, F. B. (1989).** Isolation and Characterization of Mutants of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Deficient in Acetoacetyl-Coenzyme A:Acetate/Butyrate:Coenzyme A-Transferase (EC 2.8.3.9) and in Other Solvent Pathway Enzymes. *Appl Environ Microbiol* **55**, 970-976.
- Collas, F., Kuit, W., Clement, B., Marchal, R., Lopez-Contreras, A. M. & Monot, F. (2012).** Simultaneous production of isopropanol, butanol, ethanol and 2,3-butanediol by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 engineered strains. *AMB Express* **2**, 45.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J. A. (1994).** The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International journal of systematic bacteriology* **44**, 812-826.
- Conradt, H., Hohmann-Berger, M., Hohmann, H. P., Blaschkowski, H. P. & Knappe, J. (1984).** Pyruvate formate-lyase (inactive form) and pyruvate formate-lyase activating enzyme of *Escherichia coli*: isolation and structural properties. *Arch Biochem Biophys* **228**, 133-142.
- Cooksley, C. M., Davis, I. J., Winzer, K., Chan, W. C., Peck, M. W. & Minton, N. P. (2010).** Regulation of neurotoxin production and sporulation by a Putative agrBD signaling system in proteolytic *Clostridium botulinum*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4448-4460.
- Cooksley, C. M., Zhang, Y., Wang, H., Redl, S., Winzer, K. & Minton, N. P. (2012).** Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* Acetone-Butanol-Ethanol fermentation pathway. *Metab Eng.*
- Cornillot, E., Croux, C. & Soucaille, P. (1997a).** Physical and genetic map of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 chromosome. *J Bacteriol* **179**, 7426-7434.
- Cornillot, E., Nair, R. V., Papoutsakis, E. T. & Soucaille, P. (1997b).** The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. *J Bacteriol* **179**, 5442-5447.
- Cousineau, B., Smith, D., Lawrence-Cavanagh, S. & other authors (1998).** Retrohoming of a bacterial group II intron: mobility via complete reverse splicing, independent of homologous DNA recombination. *Cell* **94**, 451-462.

- Crossley, R. A., Gaskin, D. J. H., Holmes, K., Mulholland, F., Wells, J. M., Kelly, D. J., Van Vliet, A. H. M. & Walton, N. J. (2007).** Riboflavin biosynthesis is associated with assimilatory ferric reduction and iron acquisition by *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 7819-7825.
- Dai, Z., Dong, H., Zhu, Y., Zhang, Y., Li, Y. & Ma, Y. (2012).** Introducing a single secondary alcohol dehydrogenase into butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum* Rh8 switches ABE fermentation to high level IBE fermentation. *Biotechnology for biofuels* **5**, 44.
- Daruwala, R., Bhattacharyya, D. K., Kwon, O. & Meganathan, R. (1997).** Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: overexpression, purification, and characterization of a new isochorismate synthase from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 3133-3138.
- Datta, R. & Zeikus, J. G. (1985).** Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids. *Appl Environ Microbiol* **49**, 522-529.
- de Graef, M. R., Alexeeva, S., Snoep, J. L. & Teixeira de Mattos, M. J. (1999).** The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 2351-2357.
- Delany, I., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2004).** Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **52**, 1081-1090.
- Demuez, M., Cournac, L., Guerrini, O., Soucaille, P. & Girbal, L. (2007).** Complete activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners. *FEMS Microbiol Lett* **275**, 113-121.
- Desai, R. P., Harris, L. M., Welker, N. E. & Papoutsakis, E. T. (1999).** Metabolic flux analysis elucidates the importance of the acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metab Eng* **1**, 206-213.
- Desai, R. P. & Papoutsakis, E. T. (1999).** Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 936-945.
- Doremus, M. G., Linden, J. C. & Moreira, A. R. (1985).** Agitation and pressure effects on acetone-butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* **27**, 852-860.
- Drapal, N. & Bock, A. (1998).** Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. *Biochemistry* **37**, 2941-2948.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. & Trent, J. M. (1999).** Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**, 10-14.
- Dürre, P., Kuhn, A., Gottwald, M. & Gottschalk, G. (1987).** Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **26**, 268-272.
- Dürre, P., Fischer, R. J., Kuhn, A., Lorenz, K., Schreiber, W., Sturzenhofecker, B., Ullmann, S., Winzer, K. & Sauer, U. (1995).** Solventogenic enzymes of *Clostridium*

acetobutylicum: catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. *FEMS Microbiol Rev* **17**, 251-262.

Dürre, P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**, 639-648.

Dürre, P., Bohringer, M., Nakotte, S., Schaffer, S., Thormann, K. & Zickner, B. (2002). Transcriptional regulation of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 295-300.

Dürre, P. (2008). Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Ann N Y Acad Sci* **1125**, 353-362.

Dusséaux, S., Croux, C., Soucaille, P. & Meynial-Salles, I. (2013). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture. *Metabolic Engineering*.

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

Ernst, F. D., Bereswill, S., Waidner, B. & other authors (2005). Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology* **151**, 533-546.

Even, S., Burguiere, P., Auger, S., Soutourina, O., Danchin, A. & Martin-Verstraete, I. (2006). Global control of cysteine metabolism by CymR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 2184-2197.

Feustel, L., Nakotte, S. & Dürre, P. (2004). Characterization and development of two reporter gene systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 798-803.

Fischer, R. J., Helms, J. & Durre, P. (1993). Cloning, sequencing, and molecular analysis of the sol operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. *J Bacteriol* **175**, 6959-6969.

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

Florez, L. A., Roppel, S. F., Schmeisky, A. G., Lammers, C. R. & Stulke, J. (2009). A community-curated consensual annotation that is continuously updated: the *Bacillus subtilis* centred wiki SubtiWiki. *Database : the journal of biological databases and curation* **2009**, bap012.

Fontaine, L., Meynial-Salles, I., Girbal, L., Yang, X., Croux, C. & Soucaille, P. (2002). Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **184**, 821-830.

- Franke, A. E. & Clewell, D. B. (1981).** Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**, 494-502.
- Frazier, C. L., San Filippo, J., Lambowitz, A. M. & Mills, D. A. (2003).** Genetic manipulation of *Lactococcus lactis* by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1121-1128.
- Frey, M., Rothe, M., Wagner, A. F. & Knappe, J. (1994).** Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycyl radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. Studies of [2H]glycine-substituted enzyme and peptides homologous to the glycine 734 site. *J Biol Chem* **269**, 12432-12437.
- Gabriel, C. L. (1928).** Butanol fermentation process. *Ind Eng Chem* **20**, 1063-1067.
- Gerischer, U. & Dürre, P. (1990).** Cloning, sequencing, and molecular analysis of the acetoacetate decarboxylase gene region from *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **172**, 6907-6918.
- Gerischer, U. & Dürre, P. (1992).** mRNA analysis of the *adc* gene region of *Clostridium acetobutylicum* during the shift to solventogenesis. *J Bacteriol* **174**, 426-433.
- Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M. & Chou, C. P. (2009).** Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol Adv* **27**, 764-781.
- Girbal, L. & Soucaille, P. (1994).** Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. *J Bacteriol* **176**, 6433-6438.
- Girbal, L., Croux, C., Vasconcelos, I. & Soucaille, P. (1995a).** Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiology Reviews* **17**, 287-297.
- Girbal, L., Vasconcelos, I., Saint-Amans, S. & Soucaille, P. (1995b).** How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiology Reviews* **16**, 151-162.
- Girbal, L., von Abendroth, G., Winkler, M., Benton, P. M., Meynial-Salles, I., Croux, C., Peters, J. W., Happe, T. & Soucaille, P. (2005).** Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2777-2781.
- Gonzalez-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Soucaille, P. & Vasconcelos, I. (2006).** Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Appl Environ Microbiol* **72**, 96-101.
- Gorwa, M. F., Croux, C. & Soucaille, P. (1996).** Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **178**, 2668-2675.

- Gottschal, J. C. & Morris, J. G. (1981).** The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate. *FEMS Microbiology Letters* **12**, 385-389.
- Gottwald, M. & Gottschalk, G. (1985).** The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Archives of Microbiology* **143**, 42-46.
- Gray, C. T. & Gest, H. (1965).** Biological Formation of Molecular Hydrogen. *Science* **148**, 186-192.
- Green, E. M., Boynton, Z. L., Harris, L. M., Rudolph, F. B., Papoutsakis, E. T. & Bennett, G. N. (1996).** Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology* **142** (Pt 8), 2079-2086.
- Green, E. M. & Bennett, G. N. (1998).** Genetic manipulation of acid and solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnol Bioeng* **58**, 215-221.
- Green, E. M. (2011).** Fermentative production of butanol--the industrial perspective. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 337-343.
- Grimmler, C., Held, C., Liebl, W. & Ehrenreich, A. (2010).** Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of D-glucose and D-xylose. *J Biotechnol* **150**, 315-323.
- Grimmler, C., Janssen, H., Kraubetae, D., Fischer, R. J., Bahl, H., Durre, P., Liebl, W. & Ehrenreich, A. (2011).** Genome-Wide Gene Expression Analysis of the Switch between Acidogenesis and Solventogenesis in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**, 1-15.
- Grupe, H. & Gottschalk, G. (1992).** Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in Continuous Culture and Presentation of a Model for Shift Induction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3896-3902.
- Gu, Y., Jiang, Y., Wu, H. & other authors (2011).** Economical challenges to microbial producers of butanol: Feedstock, butanol ratio and titer. *Biotechnology Journal* **6**, 1348-1357.
- Guerrini, O., Burlat, B., Leger, C., Guigliarelli, B., Soucaille, P. & Girbal, L. (2008).** Characterization of two 2[4Fe4S] ferredoxins from *Clostridium acetobutylicum*. *Curr Microbiol* **56**, 261-267.
- Gyan, S., Shiohira, Y., Sato, I., Takeuchi, M. & Sato, T. (2006).** Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD(+) ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 7062-7071.
- Halpern, J. (1985).** Mechanisms of coenzyme B12-dependent rearrangements. *Science* **227**, 869-875.
- Han, B., Gopalan, V. & Ezeji, T. C. (2011).** Acetone production in solventogenic *Clostridium* species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**, 565-576.

- Hantke, K. (1987).** Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet* **210**, 135-139.
- Harold, F. M. (1970).** Antimicrobial agents and membrane function. *Adv Microb Physiol* **4**, 45-104.
- Harris, L. M., Desai, R. P., Welker, N. E. & Papoutsakis, E. T. (2000).** Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnol Bioeng* **67**, 1-11.
- Hartmanis, G. N., Klason, T. & Gatenbeck, S. (1984).** Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **20**, 66-71.
- Hartmanis, M. G. & Gatenbeck, S. (1984).** Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Appl Environ Microbiol* **47**, 1277-1283.
- Hartmanis, M. G. (1987).** Butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum*. *J Biol Chem* **262**, 617-621.
- Hastings, J. J. (1971).** Development of the fermentation industries in Great Britain. *Advances in applied microbiology* **14**, 1-45.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P. & Minton, N. P. (2007).** The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods* **70**, 452-464.
- Heap, J. T. (2009).** Development of Genetic Knock-out Systems for Clostridia. In: - *Clostridia - Molecular Biology in the Post-genomic Era*, Brüggemann, H and Gottschalk, G, Norfolk, UK : Caister Academic Press.
- Heap, J. T., Kuehne, S. A., Ehsaan, M., Cartman, S. T., Cooksley, C. M., Scott, J. C. & Minton, N. P. (2010).** The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J Microbiol Methods* **80**, 49-55.
- Heluane, H., Evans, M. R., Dagher, S. F. & Bruno-Barcena, J. M. (2011).** Meta-analysis and functional validation of nutritional requirements of solventogenic Clostridia growing under butanol stress conditions and cointegration of D-glucose and D-xylose. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4473-4485.
- Hesslinger, C., Fairhurst, S. A. & Sawers, G. (1998).** Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. *Mol Microbiol* **27**, 477-492.
- Hillmann, F., Fischer, R. J., Saint-Prix, F., Girbal, L. & Bahl, H. (2008).** PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Mol Microbiol* **68**, 848-860.

- Hillmann, F., Doring, C., Riebe, O., Ehrenreich, A., Fischer, R. J. & Bahl, H. (2009).** The role of PerR in O₂-affected gene expression of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **191**, 6082-6093.
- Hippe, H., Andreesen, J. & Gottschalk, G. (1992).** The genus *Clostridium* - Nonmedical. In: A Balows, H G Trüper, M Dworkin, W Harder, and K H Schleifer (Eds), Springer Verlag, New York, **The Prokaryotes**, p. 1800-1866.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Holt, R. A., Stephens, G. M. & Morris, J. G. (1984).** Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH. *Appl Environ Microbiol* **48**, 1166-1170.
- Hönicke, D., Janssen, H., Grimmmler, C., Ehrenreich, A. & Lutke-Eversloh, T. (2012).** Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol:acetone ratios. *New biotechnology* **29**, 485-493.
- Hönicke, D., Lütke-Eversloh, T., Liu, Z., Lehmann, D., Liebl, W. & Ehrenreich, A. (2014).** Chemostat cultivation and transcriptional analyses of *Clostridium acetobutylicum* mutants with defects in the acid and acetone biosynthetic pathways. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 9777-9794.
- Hu, S., Zheng, H., Gu, Y. & other authors (2011).** Comparative genomic and transcriptomic analysis revealed genetic characteristics related to solvent formation and xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* EA 2018. *BMC Genomics* **12**, 93.
- Huang, K. X., Huang, S., Rudolph, F. B. & Bennett, G. N. (2000).** Identification and characterization of a second butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**, 33-38.
- Huang, L., Gibbins, L. N. & Forsberg, C. W. (1985).** Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1043-1047.
- Hüsemann, M. & Papoutsakis, E. T. (1986).** Effect of acetoacetate, butyrate, and uncoupling ionophores on growth and product formation of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* **8**, 37-42.
- Hüsemann, M. H. W. & Papoutsakis, E. T. (1989).** Comparison between in vivo and in vitro enzyme activities in continuous and batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 585-595.
- Imlay, J. A. (2006).** Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* **59**, 1073-1082.
- Ingram, L. O. (1976).** Adaptation of membrane lipids to alcohols. *Journal of Bacteriology* **125**, 670-678.
- Isken, S. & de Bont, J. A. (1998).** Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles : life under extreme conditions* **2**, 229-238.

- Islam, R., Cicek, N., Sparling, R. & Levin, D. (2006).** Effect of substrate loading on hydrogen production during anaerobic fermentation by *Clostridium thermocellum* 27405. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 576-583.
- Islam, R., Cicek, N., Sparling, R. & Levin, D. (2009).** Influence of initial cellulose concentration on the carbon flow distribution during batch fermentation by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**, 141-148.
- Jabbari, S., Steiner, E., Heap, J. T., Winzer, K., Minton, N. P. & King, J. R. (2013).** The putative influence of the agr operon upon survival mechanisms used by *Clostridium acetobutylicum*. *Mathematical biosciences*.
- Jang, Y. S., Lee, J. Y., Lee, J. & other authors (2012).** Enhanced Butanol Production Obtained by Reinforcing the Direct Butanol-Forming Route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio* **3**.
- Jang, Y. S., Malaviya, A., Lee, J., Im, J. A., Lee, S. Y., Lee, J., Eom, M. H., Cho, J. H. & Seung do, Y. (2013).** Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the enhanced production of isopropanol-butanol-ethanol fuel mixture. *Biotechnol Prog* **29**, 1083-1088.
- Janssen, H. (2010).** Das Proteom und Transkriptom von *Clostridium acetobutylicum* bei unterschiedlichen pH-Werten im Chemostaten. *Universität Rostock: Dissertation*.
- Janssen, H., Doring, C., Ehrenreich, A., Voigt, B., Hecker, M., Bahl, H. & Fischer, R. J. (2010).** A proteomic and transcriptional view of acidogenic and solventogenic steady-state cells of *Clostridium acetobutylicum* in a chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 2209-2226.
- Janssen, H., Grimmler, C., Ehrenreich, A., Bahl, H. & Fischer, R. J. (2012).** A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of *Clostridium acetobutylicum*-Solvent stress caused by a transient n-butanol pulse. *J Biotechnol*.
- Janssen, P. J., Jones, D. T. & Woods, D. R. (1990).** Studies on *Clostridium acetobutylicum* glnA promoters and antisense RNA. *Mol Microbiol* **4**, 1575-1583.
- Jeter, R. M. & Roth, J. R. (1987).** Cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **169**, 3189-3198.
- Jewell, J. B., Couthino, B. J. & Kropinski, M. A. (1986).** Bioconversion of propionic, valeric, and 4-hydroxybutyric acids into the corresponding alcohols by *Clostridium acetobutylicum* NRRL 527. *Curr Microbiol* **13**, 215-219.
- Jia, K., Zhu, Y., Zhang, Y. & Li, Y. (2011).** Group II intron-anchored gene deletion in *Clostridium*. *PLoS One* **6**, e16693.
- Jiang, Y., Xu, C., Dong, F., Yang, Y., Jiang, W. & Yang, S. (2009).** Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metab Eng* **11**, 284-291.

- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C. F. F. & Ji, J. (2011).** Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**, 4080-4106.
- Jones, D. T., van der Westhuizen, a., Long, S., Allcock, E. R., Reid, S. J. & Woods, D. R. (1982).** Solvent Production and Morphological Changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 1434-1439.
- Jones, D. T. & Woods, D. R. (1986).** Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev* **50**, 484-524.
- Jones, S. W., Paredes, C. J., Tracy, B., Cheng, N., Sillers, R., Senger, R. S. & Papoutsakis, E. T. (2008).** The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biol* **9**, R114.
- Junelles, A. M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H. & Gay, R. (1988).** Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Current Microbiology* **17**, 299-303.
- Jungermann, K., Thauer, R. K. & Decker, K. (1968).** The synthesis of one-carbon units from CO₂ in *Clostridium kluveri*. *Eur J Biochem* **3**, 351-359.
- Jungermann, K., Wood, N. P., Kirchniawy, H. & Thauer, R. K. (1972).** [Function and regulation of pyruvate formate lyase reaction in clostridia]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **353**, 721.
- Jungermann, K., Thauer, R. K., Leimenstoll, G. & Decker, K. (1973).** Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic *Clostridia*. *Biochim Biophys Acta* **305**, 268-280.
- Jungermann, K. A., Schmidt, W., Kirchniawy, F. H., Rupprecht, E. H. & Thauer, R. K. (1970).** Glycine formation via threonine and serine aldolase. Its interrelation with the pyruvate formate lyase pathway of one-carbon unit synthesis in *Clostridium kluveri*. *Eur J Biochem* **16**, 424-429.
- Kammler, M., Schon, C. & Hantke, K. (1993).** Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 6212-6219.
- Karberg, M., Guo, H., Zhong, J., Coon, R., Perutka, J. & Lambowitz, A. M. (2001).** Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. *Nat Biotechnol* **19**, 1162-1167.
- Kessler, D. & Knappe, J. (1996).** Anaerobic Dissimilation of Pyruvate. In *F C Neidhardt, R Curtiss III, J L Ingraham, E C C Lin, K B Low, B Magasanik, W S Reznikoff, M Riley, M Schaechter, and H E Umbarger (ed), Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology American Society for Microbiology, Washington, D. C.*, 199-205.
- Killeffer, D. H. (1927).** Butanol and acetone from corn. A description of the fermentation process. *Ind Eng Chem* **19**, 46-50.
- Kim, B. H., Bellows, P., Datta, R. & Zeikus, J. G. (1984).** Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations: Utilization of Carbon Monoxide to

Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. *Appl Environ Microbiol* **48**, 764-770.

King, P. W., Posewitz, M. C., Ghirardi, M. L. & Seibert, M. (2006). Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *J Bacteriol* **188**, 2163-2172.

Knappe, J., Schacht, J., Mockel, W., Hopner, T., Vetter, H., Jr. & Edenharder, R. (1969). Pyruvate formate-lyase reaction in *Escherichia coli*. The enzymatic system converting an inactive form of the lyase into the catalytically active enzyme. *Eur J Biochem* **11**, 316-327.

Knappe, J., Neugebauer, F. A., Blaschkowski, H. P. & Ganzler, M. (1984). Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1332-1335.

Knappe, J. & Sawers, G. (1990). A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**, 383-398.

Krauß, D. (2012). Einfluss der Redox-Balance auf die Solventogenese in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Technische Universität München: Dissertation*.

Kuehne, S. A., Heap, J. T., Cooksley, C. M., Cartman, S. T. & Minton, N. P. (2011). ClosTron-mediated engineering of *Clostridium*. *Methods Mol Biol* **765**, 389-407.

Kuehne, S. A. & Minton, N. P. (2012). ClosTron-mediated engineering of *Clostridium*. *Bioengineered* **3**, 247-254.

Kuit, W., Minton, N. P., Lopez-Contreras, A. M. & Eggink, G. (2012). Disruption of the acetate kinase (ack) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Kumar, M., Gayen, K. & Saini, S. (2013). Role of extracellular cues to trigger the metabolic phase shifting from acidogenesis to solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Bioresource technology* **138**, 55-62.

Lambowitz, A. M. & Zimmerly, S. (2011). Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a003616.

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

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

Lau, C. K., Ishida, H., Liu, Z. & Vogel, H. J. (2013). Solution structure of *Escherichia coli* FeoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. *J Bacteriol* **195**, 46-55.

Lederberg, E. M. & Cohen, S. N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**, 1072-1074.

- Lee, J., Yun, H., Feist, A. M., Palsson, B. O. & Lee, S. Y. (2008a).** Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**, 849-862.
- Lee, J., Jang, Y. S., Choi, S. J. & other authors (2012).** Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for Isopropanol-Butanol-Ethanol Fermentation. *Appl Environ Microbiol* **78**, 1416-1423.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2007).** Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **20**, 485-499.
- Lee, J. Y., Jang, Y. S., Lee, J., Papoutsakis, E. T. & Lee, S. Y. (2009).** Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* M5 for highly selective butanol production. *Biotechnol J* **4**, 1432-1440.
- Lee, S. F., Forsberg, C. W. & Gibbins, L. N. (1985).** Cellulolytic Activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **50**, 220-228.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J. & Jung, K. S. (2008b).** Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnol Bioeng* **101**, 209-228.
- Lehmann, D. & Lütke-Eversloh, T. (2011).** Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metab Eng* **13**, 464-473.
- Lehmann, D. (2012).** Neue Einblicke in den Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. *Universität Rostock: Dissertation*.
- Lehmann, D., Hönicke, D., Ehrenreich, A., Schmidt, M., Weuster-Botz, D., Bahl, H. & Lütke-Eversloh, T. (2012a).** Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**, 743-754.
- Lehmann, D., Radomski, N. & Lutke-Eversloh, T. (2012b).** New insights into the butyric acid metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**, 1325-1339.
- Lin, W. J. & Johnson, E. A. (1991).** Transposon Tn916 mutagenesis in *Clostridium botulinum*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2946-2950.
- Lindmark, D. G., Paoella, P. & Wood, N. P. (1969).** The pyruvate formate-lyase system of *Streptococcus faecalis*. I. Purification and properties of the formate-pyruvate exchange enzyme. *J Biol Chem* **244**, 3605-3612.
- Long, S., Jones, D. & Woods, D. (1984).** Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Applied Microbiology and Biotechnology* **20**, 256-261.
- Lopez-Contreras, A. M., Martens, A. A., Szijarto, N., Mooibroek, H., Claassen, P. A., van der Oost, J. & de Vos, W. M. (2003).** Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC

824 of CelG, a cellulosomal glycoside hydrolase belonging to family 9. *Appl Environ Microbiol* **69**, 869-877.

Lopez-Contreras, A. M., Gabor, K., Martens, A. A., Renckens, B. A., Claassen, P. A., Van Der Oost, J. & De Vos, W. M. (2004). Substrate-induced production and secretion of cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5238-5243.

Lütke-Eversloh, T., Fischer, A., Remminghorst, U. & other authors (2002). Biosynthesis of novel thermoplastic polythioesters by engineered *Escherichia coli*. *Nature materials* **1**, 236-240.

Lütke-Eversloh, T. & Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr Opin Biotechnol*.

Lütke-Eversloh, T. (2014). Application of new metabolic engineering tools for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Lutz, S., Jacobi, A., Schlenz, V., Böhm, R., Sawers, G. & Bock, A. (1991). Molecular characterization of an operon (hyp) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 123-135.

Lyrstis, M., Boynton, Z. L., Petersen, D., Kann, Z., Bennett, G. N. & Rudolph, F. B. (2000). Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding flagellin, *flaC*, and the posttranslational modification of flagellin, FlaC, from *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Anaerobe* **6**, 69-79.

Mack, M., van Loon, A. P. & Hohmann, H. P. (1998). Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. *J Bacteriol* **180**, 950-955.

Maddox, I. S., Steiner, E., Hirsch, S., Wessner, S., Gutierrez, N. A., Gapes, J. R. & Schuster, K. C. (2000). The cause of "acid-crash" and "acidogenic fermentations" during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE-) fermentation process. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**, 95-100.

Mao, S., Luo, Y., Zhang, T. & other authors (2010). Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield. *J Proteome Res* **9**, 3046-3061.

Mascal, M. (2012). Chemicals from biobutanol: technologies and markets. *Biofuels Bioprod Bioref* **6**, 483-493.

Matsuura, M., Saldanha, R., Ma, H. & other authors (1997). A bacterial group II intron encoding reverse transcriptase, maturase, and DNA endonuclease activities: biochemical demonstration of maturase activity and insertion of new genetic information within the intron. *Genes Dev* **11**, 2910-2924.

Mattsson, D. M. & Rogers, P. (1994). Analysis of Tn916-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* altered in solventogenesis and sporulation. *Journal of industrial microbiology* **13**, 258-268.

- McCoy, E., Fred, E. B., Peterson, W. H. & Hastings, E. G. (1926). A cultural study of the acetone butyl alcohol organism. *J Infect Dis* **39**, 457-483.
- McLaughlin, K. J., Strain-Damerell, C. M., Xie, K., Brekasis, D., Soares, A. S., Paget, M. S. & Kielkopf, C. L. (2010). Structural basis for NADH/NAD⁺ redox sensing by a Rex family repressor. *Mol Cell* **38**, 563-575.
- Mead, G. C. (1971). The amino acid-fermenting clostridia. *J Gen Microbiol* **67**, 47-56.
- Meinecke, B., Bertram, J. & Gottschalk, G. (1989). Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol* **152**, 244-250.
- Mermelstein, L. D., Welker, N. E., Bennett, G. N. & Papoutsakis, E. T. (1992). Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Nature Biotechnology* **10**, 190-195.
- Mermelstein, L. D. & Papoutsakis, E. T. (1993). In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1077-1081.
- Meyer, C. L., McLaughlin, J. K. & Papoutsakis, E. T. (1985). The effect of CO on growth and product formation in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* **7**, 37-42.
- Meyer, C. L., Roos, J. W. & Papoutsakis, E. T. (1986). Carbon monoxide gasing leads to alcohol production and butyrate uptake without acetone formation in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **24**, 159-167.
- Meyer, C. L. & Papoutsakis, E. T. (1989). Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 450-459.
- Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., Perumov, D. A. & Nudler, E. (2002). Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* **111**, 747-756.
- Mitchell, W. J. (1992). Carbohydrate assimilation by saccharolytic clostridia. *Res Microbiol* **143**, 245-250.
- Mitchell, W. J. (1998). Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv Microb Physiol* **39**, 31-130.
- Monot, F., Martin, J. R., Petitdemange, H. & Gay, R. (1982). Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 1318-1324.
- Moreira, A. R., Ulmer, C. D. & Linden, C. J. (1981). Butanol toxicity in the butylic fermentation. *Biotechnol Bioeng Symp* **11**, 567-579.

- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Muralidhara, B. K. & Wittung-Stafshede, P. (2005).** FMN binding and unfolding of *Desulfovibrio desulfuricans* flavodoxin: "hidden" intermediates at low denaturant concentrations. *Biochim Biophys Acta* **1747**, 239-250.
- Murray, W. D., Wemyss, K. B. & Khan, A. W. (1983).** Increased Ethanol Production and Tolerance by a Pyruvate-Negative Mutant of *Clostridium saccharolyticum*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 71-74.
- Nair, R. V., Bennett, G. N. & Papoutsakis, E. T. (1994).** Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **176**, 871-885.
- Nair, R. V. & Papoutsakis, E. T. (1994).** Expression of plasmid-encoded aad in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production. *J Bacteriol* **176**, 5843-5846.
- Nair, R. V., Green, E. M., Watson, D. E., Bennett, G. N. & Papoutsakis, E. T. (1999).** Regulation of the sol locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. *Journal of Bacteriology* **181**, 319-330.
- Nakayama, S., Kosaka, T., Hirakawa, H., Matsuura, K., Yoshino, S. & Furukawa, K. (2008).** Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster hupCBA in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**, 483-493.
- Narberhaus, F. & Bahl, H. (1992).** Cloning, sequencing, and molecular analysis of the groESL operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **174**, 3282-3289.
- Narberhaus, F., Giebeler, K. & Bahl, H. (1992).** Molecular characterization of the dnaK gene region of *Clostridium acetobutylicum*, including grpE, dnaJ, and a new heat shock gene. *J Bacteriol* **174**, 3290-3299.
- Ni, Y. & Sun, Z. (2009).** Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Appl Microbiol Biotechnol* **83**, 415-423.
- Nicolet, Y., Lemon, B. J., Fontecilla-Camps, J. C. & Peters, J. W. (2000).** A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. *Trends Biochem Sci* **25**, 138-143.
- Noack S., Köpke M. & P., D. (2009).** Microbially produced fuels and other biofuels. In: *New research on biofuels* (Ed: Wright, HJ und Evans, AD), Nova Science Publishers, Hauppauge, NY (USA).
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V. & other authors (2001).** Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **183**, 4823-4838.

- O'Brien, R. W. & Morris, J. G. (1971).** Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *J Gen Microbiol* **68**, 307-318.
- Ounine, K., Petitdemange, H., Raval, G. & Gay, R. (1985).** Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **49**, 874-878.
- Pagels, M., Fuchs, S., Pane-Farre, J. & other authors (2010).** Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **76**, 1142-1161.
- Papoutsakis, E. T. (1983).** "A useful equation for fermentations of butyric acid bacteria". The acetone-butanol fermentation and related topics. In: *J D Bu'Lock and A J Bu'Lock (ed), Science and technology letters, Kew, Surrey, United Kingdom*, 121-126.
- Papoutsakis, E. T. (2008).** Engineering solventogenic clostridia. *Curr Opin Biotechnol* **19**, 420-429.
- Paredes, C. J., Rigoutsos, I. & Papoutsakis, E. T. (2004).** Transcriptional organization of the *Clostridium acetobutylicum* genome. *Nucleic Acids Res* **32**, 1973-1981.
- Paredes, C. J., Alsaker, K. V. & Papoutsakis, E. T. (2005).** A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat Rev Microbiol* **3**, 969-978.
- Pasteur, L. (1861a).** Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations. *C R Hebd Seances Acad Sci* **52**, 344-347.
- Pasteur, L. (1861b).** Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *C R Hebd Seances Acad Sci* **52**, 1260-1264.
- Pasteur, L. (1862).** Quelques résultats nouveaux relatifs aux fermentations acétique et butyrique. *Bull Soc Chim Paris*, 52-53.
- Peguin, S., Goma, G., Delorme, P. & Soucaille, P. (1994).** Metabolic flexibility of *Clostridium acetobutylicum* in response to methyl viologen addition. *Applied Microbiology and Biotechnology* **42**, 611-616.
- Peguin, S. & Soucaille, P. (1995).** Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Appl Environ Microbiol* **61**, 403-405.
- Peguin, S. & Soucaille, P. (1996).** Modulation of metabolism of *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture in a three-electrode potentiostatic system with methyl viologen as electron carrier. *Biotechnol Bioeng* **51**, 342-348.
- Perret, S., Maamar, H., Belaich, J. P. & Tardif, C. (2004).** Use of antisense RNA to modify the composition of cellulosomes produced by *Clostridium cellulolyticum*. *Mol Microbiol* **51**, 599-607.

- Perutka, J., Wang, W., Goerlitz, D. & Lambowitz, A. M. (2004).** Use of computer-designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box protein and DNA helicase genes. *J Mol Biol* **336**, 421-439.
- Petersen, D. J. & Bennett, G. N. (1990).** Purification of acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and cloning of the acetoacetate decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3491-3498.
- Petersen, D. J., Cary, J. W., Vanderleyden, J. & Bennett, G. N. (1993).** Sequence and arrangement of genes encoding enzymes of the acetone-production pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Gene* **123**, 93-97.
- Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, R. & Gay, R. (1976).** Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductases in clostridia of the butyric group. *Biochim Biophys Acta* **421**, 334-337.
- Petitdemange, H., Cherrier, C., Bengone, J. & Gay, R. (1977).** Study of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductase activities in *Clostridium acetobutylicum*. *Canadian journal of microbiology* **23**, 152 - 160.
- Pich, O. Q., Carpenter, B. M., Gilbreath, J. J. & Merrell, D. S. (2012).** Detailed analysis of *Helicobacter pylori* Fur-regulated promoters reveals a Fur box core sequence and novel Fur-regulated genes. *Mol Microbiol* **84**, 921-941.
- Posewitz, M. C., King, P. W., Smolinski, S. L., Zhang, L., Seibert, M. & Ghirardi, M. L. (2004).** Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J Biol Chem* **279**, 25711-25720.
- Rao, G. & Mutharasan, R. (1987).** Altered Electron Flow in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum* Induced by Viologen Dyes. *Appl Environ Microbiol* **53**, 1232-1235.
- Ravcheev, D. A., Li, X., Latif, H. & other authors (2012).** Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor Rex. *J Bacteriol* **194**, 1145-1157.
- Reysenbach, A. L., Ravenscroft, N., Long, S., Jones, D. T. & Woods, D. R. (1986).** Characterisation, biosynthesis, and regulation of granulose in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **52**, 185-190.
- Rodel, W., Plaga, W., Frank, R. & Knappe, J. (1988).** Primary structures of *Escherichia coli* pyruvate formate-lyase and pyruvate-formate-lyase-activating enzyme deduced from the DNA nucleotide sequences. *Eur J Biochem* **177**, 153-158.
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2003).** Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *J Biol Chem* **278**, 41148-41159.
- Rogers, P. (1984).** Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. *Appl Microbiol* **31**, 1-60.

- Rogers, P. (1999).** Clostridia, Solvent Formation. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation
In: Wiley Biotechnology Encyclopedias, MC Flickinger and SW Drew (first edition), Wiley-Intersciences., p. 670-687.
- Rose, A. H. (1961).** Industrial Microbiology. *Butterworths, London*, 160-166.
- Sabathe, F., Belaich, A. & Soucaille, P. (2002).** Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett* **217**, 15-22.
- Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K. & Soucaille, P. (2001).** Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. *J Bacteriol* **183**, 1748-1754.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sato, K., Tomita, M., Yonemura, S., Goto, S., Sekine, K., Okuma, E., Takagi, Y., Honnami, K. & Saiki, T. (1993).** Characterization of and hyper ethanol production by *Clostridium thermocellum* I-1-B. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 2116–2121.
- Sauer, U. & Dürre, P. (1993).** Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding a small heat shock protein of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **175**, 3394-3400.
- Sauer, U. & Dürre, P. (1995).** Differential induction of genes related to solvent formation during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Letters* **125**, 115-120.
- Schaffer, S., Isci, N., Zickner, B. & Durre, P. (2002).** Changes in protein synthesis and identification of proteins specifically induced during solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Electrophoresis* **23**, 110-121.
- Schardinger, F. (1904).** Acetongärung. *Wiener Klin Wochenschr* **17**, 207-209.
- Schau, M., Chen, Y. & Hulett, F. M. (2004).** *Bacillus subtilis* YdiH is a direct negative regulator of the cydABCD operon. *J Bacteriol* **186**, 4585-4595.
- Scheel, M. & Lütke-Eversloh, T. (2013).** New options to engineer biofuel microbes: Development and application of a high-throughput screening system. *Metabolic Engineering* **17C**, 51-58.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- Schiel, B. (2006).** Regulation der Lösungsmittelbildung in *Clostridium acetobutylicum* durch DNA-bindende Proteine. *Dissertation, Universität Ulm*.

- Schulz, F. (2013).** Fluoreszenzproteine in *Clostridium acetobutylicum* - Ein neues in vivo Reportersystem. *Universität Rostock: Dissertation.*
- Schwartz, M. (2001).** The life and works of Louis Pasteur. *J Appl Microbiol* **91**, 597-601.
- Schwarz, K. M., Kuit, W., Grimmner, C., Ehrenreich, A. & Kengen, S. W. (2012).** A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of *Clostridium acetobutylicum* - Cellular behavior in adaptation to n-butanol. *J Biotechnol.*
- Schwarzer, M. (2010).** Physiologische Untersuchungen zur Regulation des Aminosäure-Stoffwechsels von *Bacillus licheniformis* DSM13. *Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen.*
- Seibert, T. M. (2009).** Die Zellwand-Hydrolase Yoch aus *Bacillus subtilis*: Genetische Kontrolle durch das essentielle Zwei-Komponenten System YycFG, hohe Osmolarität und Kältestress. . *Dissertation, Philipps-Universität Marburg.*
- Servinsky, M. D., Kiel, J. T., Dupuy, N. F. & Sund, C. J. (2010).** Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology* **156**, 3478-3491.
- Shima, S. & Thauer, R. K. (2007).** A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *Chem Rec* **7**, 37-46.
- Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K. & Ermler, U. (2008).** The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science* **321**, 572-575.
- Sickmier, E. A., Brekasis, D., Paranawithana, S., Bonanno, J. B., Paget, M. S., Burley, S. K. & Kielkopf, C. L. (2005).** X-ray structure of a Rex-family repressor/NADH complex insights into the mechanism of redox sensing. *Structure* **13**, 43-54.
- Sillers, R., Chow, A., Tracy, B. & Papoutsakis, E. T. (2008).** Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance. *Metab Eng* **10**, 321-332.
- Sillers, R., Al-Hinai, M. A. & Papoutsakis, E. T. (2009).** Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Biotechnol Bioeng* **102**, 38-49.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Sparling, R., Islam, R., Cicek, N., Carere, C., Chow, H. & Levin, D. B. (2006).** Formate synthesis by *Clostridium thermocellum* during anaerobic fermentation. *Canadian journal of microbiology* **52**, 681-688.
- Stephanopoulos, G. & Vallino, J. J. (1991).** Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* **252**, 1675-1681.

- Takahashi, S., Abbe, K. & Yamada, T. (1982).** Purification of pyruvate formate-lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. *J Bacteriol* **149**, 1034-1040.
- Talaat, A. M., Howard, S. T., Hale, W. t., Lyons, R., Garner, H. & Johnston, S. A. (2002).** Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* **30**, e104.
- Tangney, M. & Mitchell, W. J. (2007).** Characterisation of a glucose phosphotransferase system in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 398-405.
- Tanous, C., Soutourina, O., Raynal, B. & other authors (2008).** The CymR regulator in complex with the enzyme CysK controls cysteine metabolism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **283**, 35551-35560.
- Terracciano, J. S. & Kashket, E. R. (1986).** Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **52**, 86-91.
- Thakor, N., Lütke-Eversloh, T. & Steinbuchel, A. (2005).** Application of the BPEC pathway for large-scale biotechnological production of poly(3-mercaptopropionate) by recombinant *Escherichia coli*, including a novel in situ isolation method. *Appl Environ Microbiol* **71**, 835-841.
- Tauer, R. K., Rupprecht, E. & Jungermann, K. (1970).** The synthesis of one-carbon units from CO(2) via a new ferredoxin dependent monocarboxylic acid cycle. *FEBS Lett* **8**, 304-307.
- Tauer, R. K., Kirchniawy, F. H. & Jungermann, K. A. (1972).** Properties and function of the pyruvate-formate-lyase reaction in clostridia. *Eur J Biochem* **27**, 282-290.
- Tauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977).** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews* **41**, 100-180.
- Tauer, R. K., Klein, A. R. & Hartmann, G. C. (1996).** Reactions with Molecular Hydrogen in Microorganisms: Evidence for a Purely Organic Hydrogenation Catalyst. *Chem Rev* **96**, 3031-3042.
- Thomason, M. K. & Storz, G. (2010).** Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet* **44**, 167-188.
- Thorneley, R. N. (1974).** A convenient electrochemical preparation of reduced methyl viologen and a kinetic study of the reaction with oxygen using an anaerobic stopped-flow apparatus. *Biochim Biophys Acta* **333**, 487-496.
- Tishkov, V. I. & Popov, V. O. (2006).** Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular engineering* **23**, 89-110.
- Tummala, S. B., Junne, S. G. & Papoutsakis, E. T. (2003a).** Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *J Bacteriol* **185**, 3644-3653.

- Tummala, S. B., Welker, N. E. & Papoutsakis, E. T. (2003b).** Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **185**, 1923-1934.
- Ullmann, S., Kuhn, A. & Dürre, P. (1996).** DNA topology and gene expression in *Clostridium acetobutylicum*: Implications for the regulation of solventogenesis. *Biotechnol Lett* **18**, 1413-1418.
- Vasconcelos, I., Girbal, L. & Soucaille, P. (1994).** Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J Bacteriol* **176**, 1443-1450.
- Vasileva, D., Janssen, H., Hönicke, D., Ehrenreich, A. & Bahl, H. (2012).** Effect of iron limitation and fur gene inactivation on the transcriptional profile of the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology*.
- Vasileva, D. (2014).** The role of the Fur protein for maintenance of iron homeostasis in the strictly anaerobic bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Universität Rostock: Dissertation*.
- Venkataramanan, K. P., Jones, S. W., McCormick, K. P., Kunjeti, S. G., Ralston, M. T., Meyers, B. C. & Papoutsakis, E. T. (2013).** The *Clostridium* small RNome that responds to stress: the paradigm and importance of toxic metabolite stress in *C. acetobutylicum*. *BMC Genomics* **14**, 849.
- Vignais, P. M. & Colbeau, A. (2004).** Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol* **6**, 159-188.
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2002).** Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res* **30**, 3141-3151.
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2004).** Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends in genetics : TIG* **20**, 44-50.
- Volk, W. A., Bizzini, B., Jones, K. R. & Macrina, F. L. (1988).** Inter- and intrageneric transfer of Tn916 between *Streptococcus faecalis* and *Clostridium tetani*. *Plasmid* **19**, 255-259.
- Vollherbst-Schneck, K., Sands, J. A. & Montenecourt, B. S. (1984).** Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **47**, 193-194.
- Wachtershauser, G. (1992).** Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog Biophys Mol Biol* **58**, 85-201.
- Wagner, A. F., Frey, M., Neugebauer, F. A., Schafer, W. & Knappe, J. (1992).** The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 996-1000.

- Wagner, E. G. & Simons, R. W. (1994).** Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol* **48**, 713-742.
- Walter, K. A., Nair, R. V., Cary, J. W., Bennett, G. N. & Papoutsakis, E. T. (1993).** Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **134**, 107-111.
- Walter, K. A., Mermelstein, L. D. & Papoutsakis, E. T. (1994).** Studies of recombinant *Clostridium acetobutylicum* with increased dosages of butyrate formation genes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **721**, 69-72.
- Wang, E., Bauer, M. C., Rogstam, A., Linse, S., Logan, D. T. & von Wachenfeldt, C. (2008).** Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. *Mol Microbiol* **69**, 466-478.
- Wang, Q., Venkataramanan, K. P., Huang, H., Papoutsakis, E. T. & Wu, C. H. (2013).** Transcription factors and genetic circuits orchestrating the complex, multilayered response of *Clostridium acetobutylicum* to butanol and butyrate stress. *BMC Syst Biol* **7**, 120.
- Wang, S., Zhang, Y., Dong, H., Mao, S., Zhu, Y., Wang, R., Luan, G. & Li, Y. (2011).** Formic acid triggers the "Acid Crash" of acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1674-1680.
- Wang, S., Zhu, Y., Zhang, Y. & Li, Y. (2012).** Controlling the oxidoreduction potential of the culture of *Clostridium acetobutylicum* leads to an earlier initiation of solventogenesis, thus increasing solvent productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**, 1021-1030.
- Watson, R., Wright, C. J., McBurney, T., Taylor, A. J. & Linforth, R. S. (2002).** Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds. *J Exp Bot* **53**, 2121-2129.
- Weidner, G. & Sawers, G. (1996).** Molecular characterization of the genes encoding pyruvate formate-lyase and its activating enzyme of *Clostridium pasteurianum*. *J Bacteriol* **178**, 2440-2444.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B. & Papoutsakis, E. T. (1989a).** Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Appl Environ Microbiol* **55**, 323-329.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B. & Papoutsakis, E. T. (1989b).** Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. *Appl Environ Microbiol* **55**, 317-322.
- Wietzke, M. & Bahl, H. (2012).** The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Wietzke, M. (2013).** Der Redoxsensor Rex – Ein Transkriptionsregulator der Lösungsmittelbildung in *Clostridium acetobutylicum*. *Universität Rostock: Dissertation*.
- Wilkinson, S. R. & Young, M. (1994).** Targeted integration of genes into the *Clostridium acetobutylicum* chromosome. *Microbiol* **140**, 89-95.

- Winkler, W. C., Cohen-Chalamish, S. & Breaker, R. R. (2002).** An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15908-15913.
- Winzer, K., Lorenz, K., Zickner, B. & Durre, P. (2000).** Differential regulation of two thiolase genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**, 531-541.
- Wolfe, R. S. (1999).** Anaerobic life-a centennial view. *J Bacteriol* **181**, 3317-3320.
- Wood, N. P. & Jungermann, K. (1972).** Inactivation of the pyruvate formate lyase of *Clostridium butyricum*. *FEBS Lett* **27**, 49-52.
- Woolley, R. C., Pennock, A., Ashton, R. J., Davies, A. & Young, M. (1989).** Transfer of Tn1545 and Tn916 to *Clostridium acetobutylicum*. *Plasmid* **22**, 169-174.
- Worst, D. J., Gerrits, M. M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & Kusters, J. G. (1998).** *Helicobacter pylori* ribBA-mediated riboflavin production is involved in iron acquisition. *J Bacteriol* **180**, 1473-1479.
- Yao, J., Zhong, J. & Lambowitz, A. M. (2005).** Gene targeting using randomly inserted group II introns (targetrons) recovered from an *Escherichia coli* gene disruption library. *Nucleic Acids Res* **33**, 3351-3362.
- Yu, Y., Tangney, M., Aass, H. C. & Mitchell, W. J. (2007).** Analysis of the mechanism and regulation of lactose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1842-1850.
- Zhang, Y., Yu, M. & Yang, S. T. (2012).** Effects of *ptb* knockout on butyric acid fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnol Prog* **28**, 52-59.
- Zhang, Y. & Ezeji, T. C. (2013).** Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 to elucidate role of furfural stress during acetone butanol ethanol fermentation. *Biotechnology for biofuels* **6**, 66.
- Zhao, Y., Tomas, C. A., Rudolph, F. B., Papoutsakis, E. T. & Bennett, G. N. (2005).** Intracellular butyryl phosphate and acetyl phosphate concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and their implications for solvent formation. *Appl Environ Microbiol* **71**, 530-537.
- Zheng, Y. N., Li, L. Z., Xian, M., Ma, Y. J., Yang, J. M., Xu, X. & He, D. Z. (2009).** Problems with the microbial production of butanol. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**, 1127-1138.
- Zhong, J., Karberg, M. & Lambowitz, A. M. (2003).** Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. *Nucleic Acids Res* **31**, 1656-1664.
- Zirngibl, C., Hedderich, R. & Thauer, R. K. (1990).** N⁵,N¹⁰-Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity. *FEBS Lett* **261**, 112-116.

8. Anhang

Tabelle A15: Verwendete Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
ErmRAM_Fwd	ACGCGTTATATTGATAAAAATAATAATAGTG GG	Screening Primer
ErmRAM_Rev	ACGCGTGCGACTCATAGAATTATTCCTCCC G	ErmRAM
pMTL007C-E2_Fwd	GGGTGTAGTAGCCTGTGAAAT	Intron-spez. Primer
pMTL007C-E2_Rev	ATCGCTTTCGTTTCGTTCC	Intron-spez. Primer
EBS Universal	CGAAATTAGAACTTGCGTTCAGTAAAC	Intron-spez. Primer
IBS_pdc-843 844s	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGACTGCATT ATTGTGCGCCAGATAGGGTG	<i>pdc</i> -spez. Primer
EBS1d_pdc-843 844s	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAA GTCATTATTAGTAACTTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 843./843. bp,
EBS2_pdc-843 844s	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTCAGTCTC GATAGAGGAAAGTGTCT	Score: 9,058)
IBS_pflA- 60 61s	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGGAATCAG AGTTGTGCGCCAGATAGGGTG	<i>pflA</i> -spez. Primer
EBS1d_pflA- 60 61s	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAA GTCAGAGTTGTTAACTTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 60./61. bp, Score: 8,963)
EBS2_pflA- 60 61s	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTATTCCTC GATAGAGGAAAGTGTCT	
IBS_pflB-1335 1336s	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAAATTCGAT TTAGTGCGCCAGATAGGGTG	<i>pflB</i> -spez. Primer
EBS1d_pflB-1335 1336s	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAA GTCGATTTAGTAACTTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 1335./1336. bp,
EBS2_pflB-1335 1336s	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTAATTCC GATAGAGGAAAGTGTCT	Score: 9,339)
Hbd_Fwd	TTCTCTTGTCTATGCCATCTAA	Kontrolle <i>hbd</i> -
Hbd_Rev	TTGGCTATAGTTGGTGATGTAA	Clostron-Mutante
Adc_Fwd	CCATGGCTGTTTAGAAAGAAATAC	Kontrolle <i>adc</i> -
Adc_Rev	CTAGAGGCGATTTATAATGTGAAG	Clostron-Mutante
Pta_Fwd	TATTGGCATTATGAAGGGAGA	Kontrolle <i>pta</i> -
Pta_Rev	ATCCTTTAGCGAGTACAGTTT	Clostron-Mutante
PflA_Fwd	TTGGGAAAAATTCATTCTATAG	Kontrolle <i>pflA</i> -
PflA_Rev	TTTCTTCATAACTACCACATCC	Clostron-Mutante

PflB_Fwd	ATGCAATTCAATATGAAAATGATG	Kontrolle <i>pflB</i> -
PflB_Rev	GCCATAAGTCCTTTCTCATAAGC	Clostron-Mutante
Pdc_Fwd	GGCTGCATGTGAATTTGTTAC	Kontrolle <i>pdC</i> -
Pdc_Rev	AAGCATCTTTCATCGTAATAGG	Clostron-Mutante
Ptb_Fwd	TATTTATTGCCTGCAACTAAAGC	Kontrolle <i>ptb</i> -
Ptb_Rev	ATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATG	Clostron-Mutante
AmyA_Fwd	CGCATCATAAGTTATCGTTACAC	Kontrolle pSOL1
AmyA_Rev	CTTGGGAGTTACGATGATTTTC	
AdhE2_Fwd	GCAGCTGTAAAGCAGG	Kontrolle <i>adhE2</i> -
AdhE2_Rev	CTATGTCAGCATTAAATAGCTCC	Clostron-Mutante
Buk_Fwd	GTTTCATCTTCTCCACCATATCTAAC	<i>real-time</i> RT-PCR
Buk_Rev	CAATAATCTTAACAGGCGGAATTG	
RibD0590_Fwd	GCTGAGGTAAATGCTTTAAATATGG	<i>real-time</i> RT-PCR
RibD0590_Rev	TTTATTCCCGCTTTAACTACCG	
RibB0591_Fwd	TGGAGATAGCATAGCAGTAAAC	<i>real-time</i> RT-PCR
RibB0591_Rev	CTCCTAATGCCAAAGCTCTTTC	
RibA0592_Fwd	TGTTGTAGACGATGAAGATAGAG	<i>real-time</i> RT-PCR
RibA0592_Rev	CCATGCTATCTGAATCCATAGG	
RibH0593_Fwd	AATTGTAGCAGGGAGATTTAATG	<i>real-time</i> RT-PCR
RibH0593_Rev	TTTACCACTTTCAGCCATCTTC	
IntronII_probe_Fwd	CGCGACTCATAGAATTATTTCC	Southern Blotting
IntronII_probe_Rev	ATACTCAGGCCTCAATTAACC	
AtpB_Fwd	ATGGAGCTAGGTGCAAAGAC	Check-Primer RNA-
AtpB_Rev	GAACCCATGAAGAGGTAAGT	Isolierung
AtpH_Rev	ACATCATCGCCAACTCTTAC	

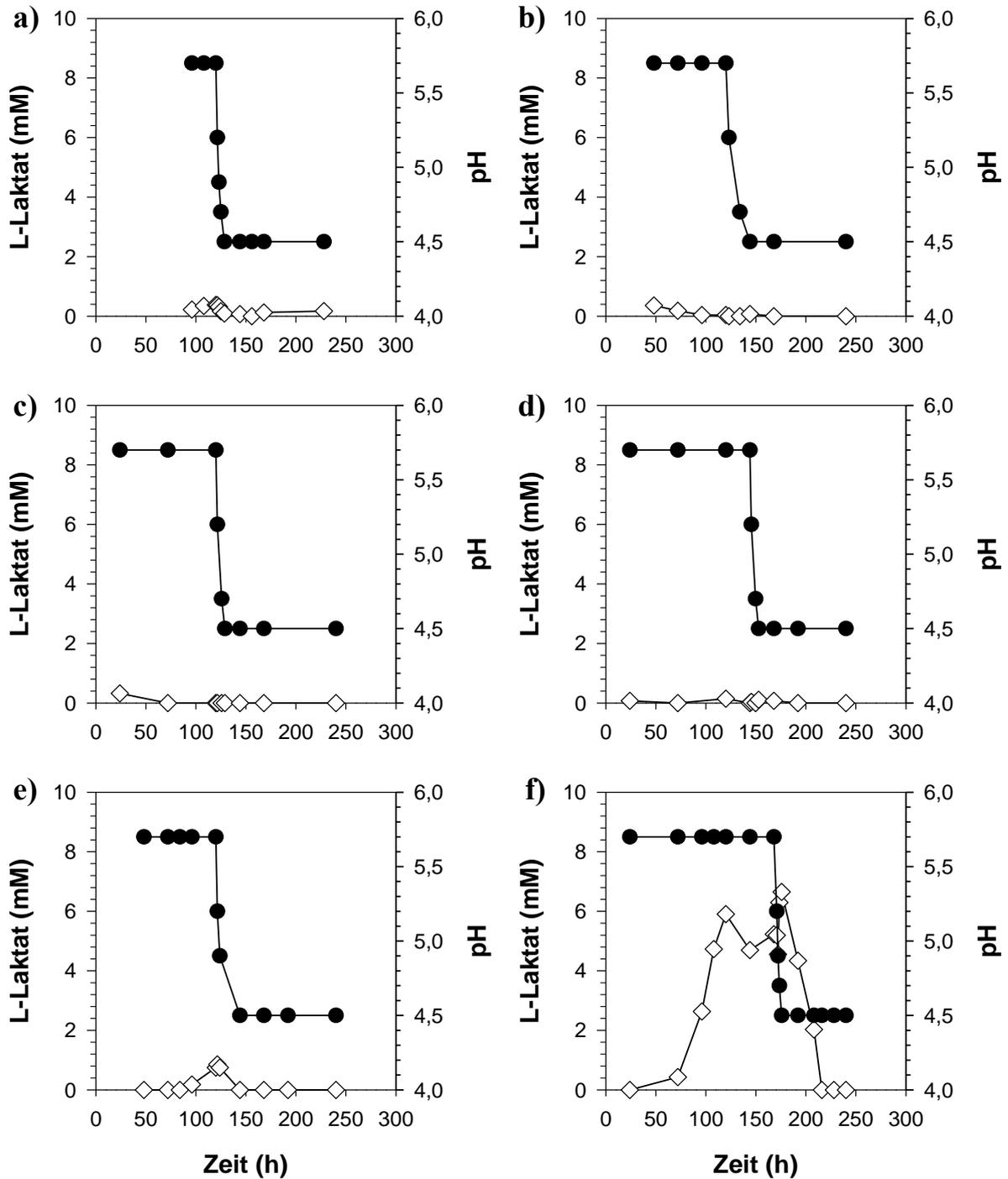


Abbildung A33: Übersicht zur Bestimmung von L-Laktat im Rahmen der physiologischen Charakterisierung von *C. acetobutylicum*-Mutanten mit einem Defekt im Säure- und/oder Aceton-Stoffwechsel sowie *C. acetobutylicum* ATCC 824 als Referenz. Die verschiedenen Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in einem pH-kontrollierten Chemostaten kultiviert (2.5.4). a) *C. acetobutylicum* ATCC 824; b) *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*; c) *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*; d) *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* Δ RAM-*pta::int(80)*; e) *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*; f) *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* in Gegenwart von 20 mM Butyrat.

Tabelle A16: Die wichtigsten Parameter der kontinuierlichen Kultivierung von *C. acetobutylicum*-Mutanten mit einem Defekt im Säure- und/oder Aceton-Stoffwechsel sowie *C. acetobutylicum* ATCC 824 als Referenz. WT: Wildtyp; *pta*: *C. acetobutylicum pta::int(80)*; *adc*: *C. acetobutylicum adc::int(180)*; *adc/pta*: *C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)*; *ptb*: *C. acetobutylicum ptb::int(87)*; *ptb**: *C. acetobutylicum ptb::int(87)* in Gegenwart von 20 mM Butyrat. Bei der gaschromatographischen Bestimmung der Metabolitkonzentrationen wurden interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt (2.6.3).

Parameter		WT	<i>pta</i>	<i>adc</i>	<i>adc/pta</i>	<i>ptb</i>	<i>ptb*</i>
Glukoseverbrauch (g/l)		27,58	23,15	28,21	24,77	25,79	21,99
OD ₆₀₀	pH 5,7	4,66	4,05	4,53	4,02	4,00	2,82
OD ₆₀₀	pH 4,5	4,04	3,74	4,24	3,71	3,74	3,79
Acetat (mM)	pH 5,7	31,22	5,07	29,13	6,08	53,69	67,88
Acetat (mM)	pH 4,5	14,28	3,32	33,01	15,78	17,56	27,44
Butyrat (mM)	pH 5,7	56,55	94,91	49,73	56,98	0	22,55
Butyrat (mM)	pH 4,5	23,85	18,51	4,78	18,68	0	9,19
Laktat (mM)	pH 5,7	0,38	0,04	0	0	0,75	5,28
Laktat (mM)	pH 4,5	0,17	0	0	0	0	0
Aceton (mM)	pH 5,7	0	0	0	0	0	0
Aceton (mM)	pH 4,5	19,91	17,99	1,75	0,77	24,32	9,95
Butanol (mM)	pH 5,7	4,78	0,13	2,02	0	29,31	34,19
Butanol (mM)	pH 4,5	45,19	38,03	23,87	19,55	46,49	29,09
Ethanol (mM)	pH 5,7	5,24	2,83	2,84	1,41	2,3	4,04
Ethanol (mM)	pH 4,5	7,72	3,28	5,45	2,76	9,43	17,83
ABE (g/l)		4,86	4,01	2,12	1,62	5,29	3,52
ABE-Verhältnis		3:9:1	7:19:1	1:7:1	1:11:3	3:8:1	1:3:1
Alkohol:Aceton (BE/A)		3,20	2,84	19,85	35,19	2,74	5,15
Ausbeute (g _{ABE} /g _{Glukose})		0,176	0,173	0,075	0,065	0,205	0,161

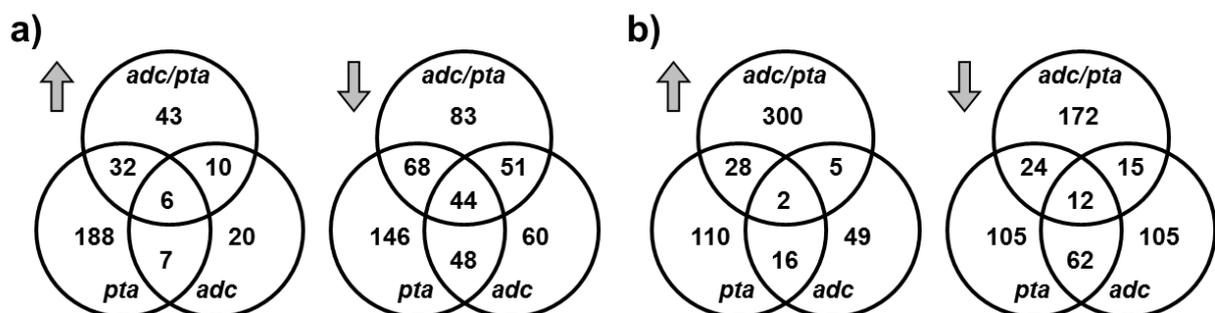


Abbildung A34: Venn-Diagramme zur Anzahl signifikant induzierter oder reprimierter Gene in Mutanten von *C. acetobutylicum* mit einem Defekt im Acetat- und/oder Aceton-Stoffwechsel während der Acidogenese (a) und Solventogenese (b). Gene dessen Expressionsverhältnis signifikant ($\geq 3,0$) gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 hochreguliert wurde sind auf der linken Seite (Pfeil nach oben) dargestellt. Die rechte Abbildung (Pfeil nach unten) gibt die Anzahl der Gene wieder dessen Transkriptmenge signifikant verringert ($\leq -3,0$) worden ist. *pta*: *C. acetobutylicum pta::int(80)*; *adc*: *C. acetobutylicum adc::int(180)*; *adc/pta*: *C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)*.

Tabelle A17: Glukose Batch-Fermentation (n=2). Dargestellt sind die wichtigsten Parameter der vergleichenden Wachstumsversuche von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* in 200 ml MS-MES ohne Acetat.

Parameter	<i>C. ac.</i> ATCC 824	<i>C. ac. ptb::int(87)</i>
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,27 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01
max. OD ₆₀₀	7,03 \pm 0,30	5,69 \pm 0,44
max. Acetat (mM)	16,49 \pm 1,81	70,08 \pm 4,44
max. Butyrat (mM)	19,69 \pm 2,95	0 \pm 0
max. Laktat (mM)	1,48 \pm 0,36	18,09 \pm 4,57
max. Aceton (mM)	108,03 \pm 5,10	2,07 \pm 0,33
max. Butanol (mM)	169,40 \pm 16,56	68,43 \pm 8,96
max. Ethanol (mM)	21,61 \pm 2,53	13,56 \pm 2,12
ABE (g/l)	19,83 \pm 1,64	5,82 \pm 0,74
Glukoseverbrauch (g/l)	55,23 \pm 1,24	34,39 \pm 1,49
Ausbeute ($g_{Aceton}/g_{Glukose}$)	0,11 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
Ausbeute ($g_{Butanol}/g_{Glukose}$)	0,23 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01
Ausbeute ($g_{Ethanol}/g_{Glukose}$)	0,02 \pm 0	0,02 \pm 0
Ausbeute ($g_{ABE}/g_{Glukose}$)	0,36 \pm 0,03	0,17 \pm 0,02

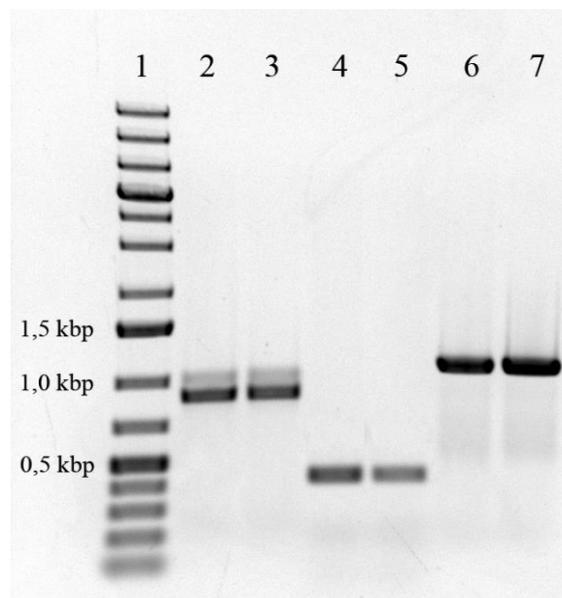


Abbildung A35: Nachweis über die Präsenz des Megaplasmids pSOL1 in *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Spuren 2, 4 und 6) und *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* (Spuren 3, 5 und 7) während des solventogenen *steady state* Wachstums (pH 4,5) mittels PCR-Analyse. Spur1: Größen- und Quantitätsmarker (Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder); Spuren 2 und 3: Adc_Fwd/Adc_Rev (890 bp); Spuren 4 und 5: AdhE2_Fwd/AdhE2_Rev (418 bp); Spuren 6 und 7: AmyA_Fwd/AmyA_Rev (1128 bp); Adc: Acetoacetat-Decarboxylase (CAP0165), AdhE2: Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase E2 (CAP0035), AmyA: Alpha-Amylase (CAP0168)

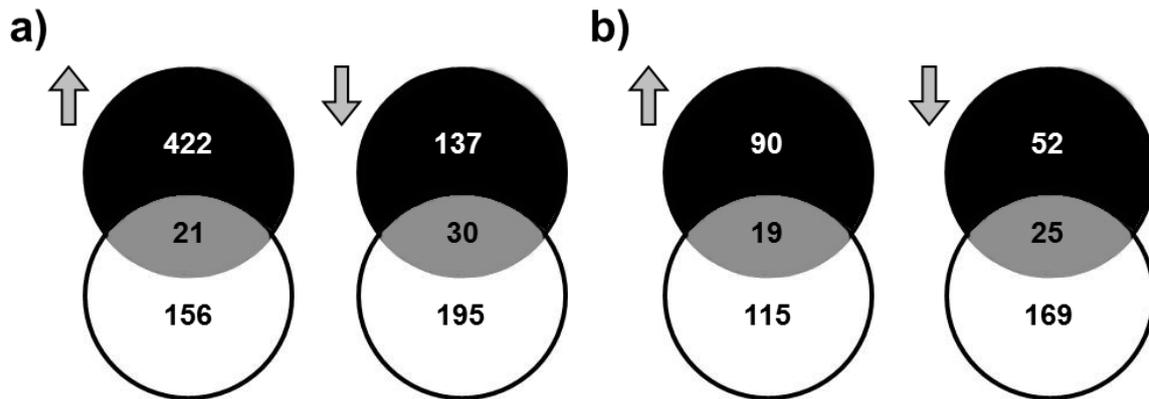


Abbildung A36: Venn-Diagramme zur Anzahl signifikant in *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* induzierter oder reprimierter Gene in Abwesenheit (schwarz) und in Gegenwart (weiß) von 20 mM Butyrat während der Acidogenese (a) sowie Solventogenese (b). Gene dessen Expressionsverhältnis signifikant ($\geq 3,0$) gegenüber dem Referenzstamm ATCC 824 hochreguliert wurde sind auf der linken Seite (Pfeil nach oben) dargestellt. Die rechte Abbildung (Pfeil nach unten) gibt die Anzahl der Gene wieder dessen Transkriptmenge signifikant verringert ($\leq -3,0$) worden ist.

Tabelle A18: Gene mit einer signifikanten Induktion des Transkriptlevels in *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* bei pH 5,7. RNA Proben wurden von acidogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant induziert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältnis (Ratio) $\geq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0001		Oxidoreductase	4,35
CAP0035	<i>adhE2</i>	adhe Aldehyde-alcohol dehydrogenase, ADHE1	24,70
CAP0066	<i>ptna</i>	ptna Mannose-specific phosphotransferase system component IIAB	443,57
CAP0067		manY/levF Mannose/fructose-specific phosphotransferase system component IIC	431,56
CAP0068	<i>Ptnd</i>	ptnd Mannose-specific phosphotransferase system component IID	161,74
CAP0083		SAM-dependent methyltransferase	3,05
CAP0106		dxs 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase, dehydrogenase	10,60
CAP0119		Possible xylan degradation enzyme (glycosyl hydrolase family 30-like domain and Ricin B-like domain)	3,31
CAP0120		Possible xylan degradation enzyme (glycosyl hydrolase family 43-like domain, cellulose-binding domain and Ricin B-like domain)	3,04
CAC0014		Aminotransferase	12,41
CAC0015	<i>serA</i>	serA D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	12,00
CAC0016		Related to HTH domain of SpoOJ/ParA/ParB/repB family, involved in chromosome partitioning	12,53
CAC0017	<i>serS</i>	serS seryl-tRNA synthetase	12,83
CAC0018		Putative NADPH-quinone reductase, YabF family	9,12
CAC0056		hypothetical protein	3,49
CAC0057		hypothetical protein	4,10
CAC0058		hypothetical protein	4,11
CAC0059		hypothetical protein	4,87
CAC0060		Predicted membrane protein	3,19
CAC0061		Phage-related protein, gp16	3,87

CAC0062		hypothetical protein	3,32
CAC0063		hypothetical protein	4,33
CAC0064		hypothetical protein	4,38
CAC0065		hypothetical protein	4,78
CAC0390		Cystathionine gamma-synthase	4,73
CAC0391		Cystathionine beta-lyase	4,08
CAC0422	<i>licT</i>	licT Transcriptional antiterminator licT	17,46
CAC0423		Fusion PTS system, beta-glucosides specific IIABC component	156,89
CAC0424		Fructokinase	119,53
CAC0425	<i>sacA</i>	sacA Sucrase-6-phosphate hydrolase (gene sacA)	137,15
CAC0426		Transcriptional regulator (HTH_ARAC-domain)	7,32
CAC0457		Transcriptional regulator, AcrR family	3,70
CAC0528		ABC transporter, ATPase component (two ATPase domains)	4,70
CAC0544		Permease	5,92
CAC0550		Possible sigma factor	3,55
CAC0552		Protein containing cell-adhesion domain	6,51
CAC0553		Hypothetical protein, CF-8 family	6,03
CAC0554		lyc Autolytic lysozyme (1,4-beta-N-acetylmuramidase), family 25 of glycosyl hydrolase , peptidoglycan-binding domain	5,66
CAC0578	<i>meth</i>	methH Cobalamine-dependent methionine synthase I (methyltransferase and cobalamine-binding domain)	3,57
CAC0765		Fe-S oxidoreductase	12,68
CAC0766		Predicted transcriptional regulator (MerR family)	11,20
CAC0767		Fe-S oxidoreductase	5,30
CAC0771		cobalt transport protein CbiM	10,07
CAC0772		Cobalt permease	7,95
CAC0773		ABC-type cobalt transport protein ATPase component	9,22
CAC0774		hypothetical protein	7,20
CAC0775		ATP-utilizing enzyme of the PP-loop superfamily	9,51
CAC0776		NCAIR mutase (PurE)-related protein	7,55
CAC0777		Acetyltransferase (the isoleucine patch superfamily)	9,31
CAC0892		3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	3,31
CAC0893		Prephenate dehydrogenase	3,04
CAC0894	<i>aroB</i>	aroB 3-dehydroquinate synthetase	3,06
CAC0895	<i>aroA</i>	aroA 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	3,07
CAC0897		aro Fusion chorismate mutase and shikimate 5-dehydrogenase	3,01
CAC0899		3-dehydroquinate dehydratase	3,13
CAC0984		ABC transporter, ATP-binding protein	3,68
CAC0985		ABC transporter, permease component	3,62
CAC0986		Lipoprotein, attached to the cytoplasmic membrane, NLPA family	3,61
CAC0992		hypothetical protein	3,56
CAC0998		Homoserine dehydrogenase	3,26
CAC0999	<i>thrC</i>	thrC threonine synthase	3,01
CAC1214		Xre family DNA-binding domain and TPR-repeat containing protein	3,17
CAC1234	<i>pheB</i>	pheB hypothetical protein	3,45
CAC1235	<i>thrB</i>	thrB Homoserine kinase (thrB)	3,28
CAC1236		hypothetical protein	3,24

CAC1392	<i>purF</i>	purF amidophosphoribosyltransferase	3,01
CAC1406		Transcriptional antiterminator (BglG family)	6,99
CAC1554		Heavy-metal-associated domain (N-terminus) and membrane-bounded cytochrome biogenesis <i>cycZ</i> -like domain, possible membrane copper tolerance protein	3,07
CAC1609		Zn-finger containing protein	3,05
CAC1655		purQ/purL bifunctional enzyme phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase (synthetase domain/glutamine amidotransferase domain)	3,03
CAC1673	<i>gltA</i>	<i>gltA</i> Large subunit of NADH-dependent glutamate synthase	4,16
CAC1674	<i>gltB</i>	<i>gltB</i> Small subunit of NADPH-dependent glutamate synthase	4,10
CAC1826		hypothetical protein	3,80
CAC1827		TldD-like protein fragment	3,78
CAC1983		hypothetical protein	3,15
CAC2241		Cation transport P-type ATPase	4,00
CAC2242		Predicted transcriptional regulator, <i>arsE</i> family	4,65
CAC2309		DNA modification methyltransferase	3,03
CAC2658	<i>glnA</i>	<i>glnA</i> Glutamine synthetase type III	3,33
CAC2681		hypothetical protein	5,86
CAC2700	<i>guaA</i>	<i>guaA</i> bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	3,85
CAC2770		Amino acid transporter	3,37
CAC2771		Amino acid transporter	3,19
CAC2809		Predicted HD superfamily hydrolase	3,87
CAC2810		Possible glucoamylase (diverged), 15 family	3,43
CAC2841		Conserved membrane protein, probable transporter, YPAA B.subtilis ortholog	6,37
CAC2847		Ribosome-associated protein Y (PSrp-1)	3,21
CAC2963	<i>lacG</i>	<i>lacG</i> 6-Phospho-Beta-D-Galactosidase	55,36
CAC2964	<i>lacE</i>	<i>lacE</i> PTS system lactose-specific enzyme IIBC	65,36
CAC2965	<i>lacF</i>	<i>lacF</i> PTS system lactose-specific enzyme IIA	88,72
CAC3087		Phosphoenolpyruvate-protein kinase (PTS system enzyme I)	5,08
CAC3092		231 amidase, germination specific (<i>cwIC/cwID</i> B.subtilis ortholog)	4,94
CAC3093		Phosphate permease	3,99
CAC3157	<i>trpA</i>	<i>trpA</i> Tryptophan synthase alpha chain	7,98
CAC3158	<i>trpB</i>	<i>trpB</i> tryptophan synthase subunit beta	7,47
CAC3159	<i>trpF</i>	<i>trpF</i> Phosphoribosylanthranilate isomerase	9,75
CAC3160	<i>trpC</i>	<i>trpC</i> Indole-3-glycerol phosphate synthase	10,38
CAC3161	<i>trpD</i>	<i>trpD</i> Anthranilate phosphoribosyltransferase	11,50
CAC3162		<i>pabA</i> Para-aminobenzoate synthase component II	10,80
CAC3163		<i>parB</i> anthranilate synthase component I	10,42
CAC3176	<i>ilvN</i>	<i>ilvN</i> Acetolactate synthase, small subunit	4,12
CAC3421		Acyl carrier protein phosphodiesterase	5,77
CAC3617		Uncharacterized membrane protein, YHAG B.subtilis homolog	11,91
CAC3657		NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3,39

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A19: Gene mit einer signifikant reprimierten Expression in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* bei pH 5,7. RNA Proben wurden von acidogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant reprimiert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältniss (Ratio) $\leq -3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0003		Transglutaminase-like predicted protease domain fused to ChW-repeats and cell-adhesion domain	-10,35
CAP0025	<i>pdC</i>	pdC Pyruvate decarboxylase	-3,09
CAP0026		hypothetical protein	-3,85
CAP0036		Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of B.subtillis	-522,18
CAP0037		Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of B.subtillis	-383,83
CAP0074		hypothetical protein	-3,23
CAP0144		Possible steroid binding protein	-3,08
CAP0148		phlC Phospholipase C	-4,18
CAP0151		Integrin-like repeats domain fused to lysozyme, LYCV glycosyl hydrolase	-12,98
CAC0078	<i>agrB</i>	agrB putative accessory gene regulator protein	-15,68
CAC0079		hypothetical protein	-12,91
CAC0082		Predicted membrane protein	-5,28
CAC0117		protein cheY homolog	-3,14
CAC0118	<i>cheA</i>	cheA Chemotaxis protein cheA	-3,94
CAC0119	<i>cheW</i>	cheW Chemotaxis protein cheW	-3,44
CAC0149		hypothetical protein	-4,43
CAC0205		Predicted phosphohydrolase, lcc family	-5,16
CAC0264		Predicted membrane protein	-3,52
CAC0304	<i>motA</i>	motA Chemotaxis motility protein A, gene motA	-15,67
CAC0305	<i>motB</i>	motB Chemotaxis motility protein B, gene motB	-14,74
CAC0352		Uncharacterized conserved membrane protein, SANA family	-3,21
CAC0353		2,3-cyclic-nucleotide 2'phosphodiesterase (duplication)	-5,32
CAC0383		PTS cellobiose-specific component IIA	-6,14
CAC0384	<i>licB</i>	licB PTS system, cellobiose-specific component BII	-5,99
CAC0385		Beta-glucosidase	-5,49
CAC0386	<i>licC</i>	licC PTS cellobiose-specific component IIC	-5,29
CAC0427		Glycerol-3-phosphate ABC-transporter, permease component	-5,38
CAC0428		Sugar permease	-4,75
CAC0429		Glycerol-3-phosphate ABC-transporter, periplasmic component	-5,52
CAC0430		Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	-4,71
CAC0435		hypothetical protein	-3,09
CAC0443		Methyl-accepting chemotaxis protein	-7,49
CAC0447	<i>feoA</i>	feoA FeoA protein, involved in Fe ²⁺ transport	-5,99
CAC0448	<i>feoB</i>	feoB Ferrous iron transport protein B (feoB-2)	-4,45
CAC0495	<i>thiC</i>	thiC Thiamine monophosphate syntase	-9,63
CAC0496		Uncharacterized conserved protein, YitT family	-11,83
CAC0587		flavodoxin	-3,06
CAC0742		Uncharacterized protein, containing predicted phosphatase domain	-4,19
CAC0877		cfa Cyclopropane fatty acid synthase	-3,28
CAC0946		ComE-like protein, Metallo beta-lactamase superfamily hydrolase, secreted	-3,56

CAC1029		FeoA-like protein, involved in iron transport	-3,04
CAC1031		feoB FeoB-like GTPase, responsible for iron uptake	-3,51
CAC1128		hypothetical protein	-5,00
CAC1233	<i>cheV</i>	chev Chemotaxis protein CheV ortholog (CheW-like adaptor domain and CheY-like receiver domain)	-9,26
CAC1319	<i>glpF</i>	glpF Glycerol uptake facilitator protein, GLPF	-9,65
CAC1321	<i>glpK</i>	glpK glycerol kinase	-8,86
CAC1322	<i>glpA</i>	glpA Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GLPA	-4,39
CAC1363	<i>sodC</i>	sodC Superoxide dismutase, Cu-Zn family	-4,44
CAC1560		hypothetical protein	-8,32
CAC1561		Glycosyltransferase, involved in cell wall biogenesis	-3,35
CAC1562		Predicted membrane protein	-6,45
CAC1600		Methyl-accepting chemotaxis-like protein (chemotaxis sensory transducer)	-10,08
CAC1601		Methyl-accepting chemotaxis-like protein (chemotaxis sensory transducer)	-9,73
CAC1602		Predicted diverged CheY-domain	-3,70
CAC1634		Flagellin	-150,95
CAC1696	<i>sigG</i>	sigG sporulation sigma factor SigG	-3,32
CAC1702		hypothetical protein	-3,98
CAC1703		Methyl-accepting chemotaxis protein (fragment)	-4,00
CAC1704		hypothetical protein	-4,90
CAC1862		hypothetical protein	-3,35
CAC1882		hypothetical protein	-3,12
CAC1883		Uncharacterized phage related protein	-3,12
CAC1885		hypothetical protein	-4,31
CAC1886		Uncharacterized phage related protein	-3,95
CAC1889		Uncharacterized phage related protein	-5,71
CAC1892		hypothetical protein	-6,74
CAC1893		ClpP family serine protease, possible phage related	-5,14
CAC1894		Phage-related, head portal protein	-9,91
CAC1895		Phage terminase-like protein, large subunit	-4,36
CAC1902		hypothetical protein	-3,02
CAC1903		hypothetical protein	-4,17
CAC1908		Predicted membrane protein	-3,12
CAC2166		Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	-5,17
CAC2167		Flagellin family protein	-8,87
CAC2171		Predicted glycosyltransferase	-3,14
CAC2174		Glycosyltransferase	-3,93
CAC2175		Glycosyltransferase	-3,40
CAC2182		hypothetical protein	-5,92
CAC2183		Uncharacterized protein, possible homolog of YJFB B. subtilis	-3,74
CAC2194		Predicted nucleoside-diphosphate sugar epimerase	-3,35
CAC2202		hypothetical protein	-4,12
CAC2203	<i>hag</i>	hag Possible hook-associated protein, flagellin family	-63,29
CAC2204		hypothetical protein	-5,25
CAC2205	<i>fliD</i>	fliD Flagellar hook-associated protein FliD	-5,89
CAC2206	<i>fliS</i>	fliS Flagellar protein FliS	-5,87
CAC2207		hypothetical protein	-4,85

CAC2208		Flagellin family protein, YVYC B.subtilis ortholog	-6,91
CAC2209		csrA Carbon storage regulator, csrA	-6,48
CAC2210		Uncharacterized protein, YVIF B.subtilis homolog	-7,22
CAC2211	<i>flgL</i>	flgL Flagellin	-7,21
CAC2212	<i>flgK</i>	FlgK Flagellar hook-associated protein FlgK	-9,08
CAC2213		hypothetical protein	-8,68
CAC2214	<i>flgM</i>	flgM Regulator of flagellin synthesis, FLGM	-8,49
CAC2216	<i>fliM</i>	FliM Flagellar switch protein FliM	-3,25
CAC2438		Predicted phosphatase	-4,52
CAC2523		Glycosyltransferase	-4,41
CAC2533		Protein containing ChW-repeats	-4,62
CAC2537		Predicted phosphatase	-3,15
CAC2586		Predicted membrane protein	-3,11
CAC2589		Glycosyltransferase	-3,27
CAC2590		hypothetical protein	-3,02
CAC2702		Possible signal transduction protein (containing EAL, CBS and GGDEF domains)	-3,78
CAC2708	<i>hbd</i>	hbd 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	-4,95
CAC2742		Predicted membrane protein	-3,79
CAC2743		Predicted permease, YXIO B.subtilis ortholog	-4,77
CAC2746		Membrane associated methyl-accepting chemotaxis protein (with HAMP domain)	-6,69
CAC2906		Spore coat protein cotS related	-7,81
CAC2938		hypothetical protein	-4,36
CAC3236		Possible transcriptional regulator from YAEG/LRPR family	-6,51
CAC3237		msmX Multiple sugar-binding ABC-transporter, MSMX ATP-binding protein	-5,51
CAC3314		Nitroreductase family protein	-3,95
CAC3352		Membrane associated methyl-accepting chemotaxis protein with HAMP domain	-4,13
CAC3408		NADH oxidase (two distinct flavin oxidoreductase domains)	-3,89
CAC3410		HD-GYP domain (HD superfamily hydrolase)	-3,37
CAC3422		Sugar proton symporter (possible xylulose)	-8,41
CAC3459		Homolog of cell division GTPase FtsZ, diverged	-3,22
CAC3510		Membrane associated methyl-accepting chemotaxis protein (with HAMP domain)	-3,49
CAC3526		FMN-binding protein	-3,95
CAC3556		Probable S-layer protein	-97,58
CAC3558		Probable S-layer protein	-49,50

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A20: Gene mit einer signifikanten Induktion des Transkriptlevels in *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* bei pH 4,5. RNA Proben wurden von solventogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant induziert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältniss (Ratio) $\geq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0035	<i>adhE2</i>	adhe Aldehyde-alcohol dehydrogenase, ADHE1	60,75
CAP0057		Putative glycoprotein or S-layer protein	3,77

CAP0058		Rare lipoprotein A RLPA related protein	5,87
CAP0064		alf Fructose-bisphosphate aldolase class I	3,31
CAP0067		manY/levF Mannose/fructose-specific phosphotransferase system component IIC	211,70
CAP0068		ptnd Mannose-specific phosphotransferase system component IID	62,50
CAP0106		dxs 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase, dehydrogenase	3,29
CAP0112		hypothetical protein	3,90
CAP0130		hypothetical protein	13,15
CAP0141		mbhs Periplasmic hydrogenase small subunit, dehydrogenase	3,36
CAC0014		Aminotransferase	10,29
CAC0015	<i>serA</i>	serA D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	9,21
CAC0016		Related to HTH domain of SpoOJ/ParA/ParB/repB family, involved in chromosome partitioning	10,21
CAC0017	<i>serS</i>	serS seryl-tRNA synthetase	11,63
CAC0018		Putative NADPH-quinone reductase, YabF family	5,82
CAC0213		Protein containing LysM motif repeat	3,15
CAC0243		Predicted permease	4,66
CAC0404		Serine/threonine protein kinase fused to TPR repeats domain	4,08
CAC0422	<i>licT</i>	licT Transcriptional antiterminator licT	4,10
CAC0423		Fusion PTS system, beta-glucosides specific IIABC component	23,63
CAC0424		Fructokinase	23,67
CAC0468		HAD superfamily hydrolase	3,52
CAC0469	<i>spmA</i>	spmA Spore maturation protein A (gene spmA)	5,01
CAC0470	<i>spmB</i>	spmB Spore maturation protein B (gene spmB)	6,40
CAC0491		Uncharacterized probably secreted protein, homolog of YDCC B.subtilis	3,30
CAC0492		alr alanine racemase	3,63
CAC0546		Uncharacterized membrane protein, homolog of Methanobacterium (2621593)	3,94
CAC0569	<i>sacT</i>	sacT SACPA operon antiterminator (sacT)	3,71
CAC0579	<i>prkA</i>	prkA Serine protein kinase (prkA protein), P-loop containing	3,62
CAC0580		hypothetical protein	4,33
CAC0581	<i>spoVR</i>	spoVR Stage V sporulation protein R	3,71
CAC0613		Spore coat protein F	3,09
CAC0614		Spore coat protein F	3,41
CAC0623		hypothetical protein	3,97
CAC0661		ABC transporter ATP-binding protein (multidrug resistance protein)	3,35
CAC0662		Sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein	3,23
CAC0663		hypothetical protein	3,34
CAC0664		Sugar-binding periplasmic protein	3,27
CAC0665		ABC-type sugar transport system, permease component	3,01
CAC0667		Sugar-binding periplasmic protein	3,13
CAC0668		Predicted membrane protein	3,37
CAC0678		CBS domains	3,09
CAC0686		Spore cortex-lytic enzyme prepeptide, peptidoglycan-binding domain	3,37
CAC0750		hypothetical protein	3,24
CAC0785		hypothetical protein	3,31
CAC0787		Uncharacterized conserved protein, repeats	4,63
CAC0808	<i>hybG</i>	hybG Hydrogenase expression factor (hybG)	3,68

CAC0846		Hypothetical protein, CF-29 family	4,04
CAC0857		Glucan phosphorylase	3,15
CAC1009		Cell wall biogenesis enzyme (N-terminal domain related to N-Acetylmuramoyl-L-alanine amidase and C-terminal domain related to L-alanoyl-D-glutamate peptidase), peptidoglycan-binding domain	3,94
CAC1043		Xre family DNA-binding domain and TPR-repeat containing protein	3,10
CAC1093		Hypothetical secreted protein	3,38
CAC1101		Hypothetical protein, CF-34 family(identical)	3,82
CAC1236		hypothetical protein	4,38
CAC1246	<i>pbpA</i>	<i>pbpA</i> Penicillin-binding protein 2	3,72
CAC1252		Possible membrane metalloendopeptidase	3,56
CAC1253		Sporulation protein IVFB related protein, predicted metallopeptidase	4,78
CAC1276		SpolIP Stage II sporulation protein P	3,75
CAC1298		Uncharacterized protein, related to B.subtilis spore coat protein COTS	3,08
CAC1336		hypothetical protein	4,95
CAC1337		Spore coat protein COTJB	5,65
CAC1338		Spore coat protein COTJC	5,47
CAC1363		<i>sodC</i> Superoxide dismutase, Cu-Zn family	6,80
CAC1402		Uncharacterized conserved protein, similar to IcaC of Staphylococcus, YHJR B.subtilis family	4,20
CAC1444		Uncharacterized conserved membrane protein, similar to MDR (VANZ) ORF of Enterococcus	3,03
CAC1446		hypothetical protein	4,39
CAC1486		Uncharacterized protein, ortholog of YKUS B.subtilis	3,36
CAC1575		hypothetical protein	3,04
CAC1614		Predicted glycosyltransferase	4,33
CAC1633		Protein from bacterioferritin family	3,88
CAC1662		hypothetical protein	3,06
CAC1664	<i>glgP</i>	<i>glgP</i> Glycogen phosphorylase	3,40
CAC1689	<i>sigK</i>	<i>sigK</i> sporulation sigma factor SigK	4,13
CAC1695	<i>sigE</i>	<i>sigE</i> sporulation sigma factor SigE	4,31
CAC1696	<i>sigG</i>	<i>sigG</i> sporulation sigma factor SigG	3,39
CAC1697		Uncharacterized conserved protein, YMXH B.subtilis homolog	4,73
CAC1745		<i>rpmF</i> Ribosomal protein L32	3,93
CAC1860		hypothetical protein	3,62
CAC1861		Fragment flavodoxin oxidoreductase	3,97
CAC1866		Putative 4-Cys ferredoxin	3,71
CAC1954		hypothetical protein	3,98
CAC2086		Stage III sporulation protein AH, SpolIIAH	3,94
CAC2087		Stage III sporulation protein AG, SpolIIAG	4,74
CAC2088		Stage III sporulation protein AF, SpolIIAF	4,34
CAC2089		Stage III sporulation protein AE, SpolIIAE	4,49
CAC2090		Stage III sporulation protein AD, SpolIIAD	4,53
CAC2091		Stage III sporulation protein AC, SpolIIAC	4,63
CAC2092		stage III sporulation protein SpoAB	4,62
CAC2093		Stage III sporulation protein AA, SpolIIAA	4,80
CAC2135		ATP-dependent serine protease LA/LON family	3,81

CAC2137		Cation transport P-type ATPase	3,20
CAC2237	<i>glgC</i>	glgC glucose-1-phosphate adenylyltransferase	3,38
CAC2238	<i>glgC</i>	glgC ADP-glucose pyrophosphorylase	4,03
CAC2239	<i>glgA</i>	glgA Glycogen synthase, glgA	3,63
CAC2240		Protein shares with cyclomaltodextrin glucoanotransferase C-terminal domain	4,64
CAC2243		asnB N-terminal domain of asparagine synthase	4,06
CAC2249		C-terminal domain of asparagine synthase	4,88
CAC2305		SpoVAC Stage V sporulation AC, SpoVAC	3,36
CAC2342		Predicted membrane protein	6,46
CAC2343		LPS biosynthesis O-acetyl transferase	3,22
CAC2344		LPS biosynthesis protein , RfbU family	3,10
CAC2345		Glycosyltransferase	3,44
CAC2346		Glycosyltransferase	3,44
CAC2348		Glycosyltransferase	3,18
CAC2349		hypothetical protein	4,34
CAC2350		Sugar transaminase, involved in dTDP-4-amino-4,6-dideoxyglucose biosynthesis	4,48
CAC2351		Glycosyltransferase	4,08
CAC2352		hypothetical protein	4,30
CAC2353		hypothetical protein	4,54
CAC2354		Nifs family aminotransferase	4,05
CAC2365	<i>sspA</i>	sspA Small acid-soluble spore protein	5,15
CAC2383		Predicted xylanase/chitin deacetylase	4,32
CAC2458		ferredoxin oxidoreductase beta subunit	3,28
CAC2460		hypothetical protein	4,03
CAC2554		hypothetical protein	4,09
CAC2555		hypothetical protein	4,12
CAC2556		Endoglucanase, family 26, S-layer homology domain	7,81
CAC2569		NimC/NimA family protein	8,95
CAC2575	<i>ruby</i>	rubY Rubrerythrin	3,07
CAC2583		Uncharacterized conserved membrane protein, YHGE B.subtilis homolog	3,85
CAC2615		Uncharacterized conserved protein, CotF B.subtilis family	3,13
CAC2616		Predicted iron-dependent transcription repressor	3,17
CAC2635		hypothetical protein	3,26
CAC2666		hypothetical protein	6,57
CAC2681		hypothetical protein	7,39
CAC2682		hypothetical protein	4,59
CAC2728		Hypothetical protein, CF-30 family	8,49
CAC2747		Protein containing LysM repeats (N-terminal domain) and domain related to chitinase	5,20
CAC2776		hypothetical protein	3,65
CAC2781		hypothetical protein	5,43
CAC2791		MoaA/NirJ family Fe-S oxidoreductase	5,21
CAC2793		Transcriptional regulator, Lrp family (possible nitrite reductase regulator NirD)	4,26
CAC2794		Transcriptional regulator, Lrp family (possible nitrite reductase regulator NirD)	4,80
CAC2795		MoaA/NirJ family Fe-S oxidoreductase	5,83
CAC2799		Uncharacterized conserved protein, similar to lppY/lpqO of M.tuberculosis	4,17
CAC2801		TPR-repeat-containing protein, secreted	3,16

CAC2859	<i>spoIIID</i>	spoIIID Stage III sporulation protein D, SpoIIID	3,09
CAC2862	<i>murA</i>	murA UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	3,88
CAC2903		LysM domain containing membrane protein	4,91
CAC2905		Uncharacterized protein, YABG B.subtilis ortholog	4,74
CAC2906		Spore coat protein cotS related	5,40
CAC2908		Spore coat protein cotS related	3,49
CAC2909		Spore coat protein cotS related (diverged)	4,32
CAC2910		Spore coat protein cotS related	4,64
CAC2963	<i>lacG</i>	lacG 6-Phospho-Beta-D-Galactosidase	22,44
CAC2964	<i>lacE</i>	lacE PTS system lactose-specific enzyme IIBC	28,29
CAC2965	<i>lacF</i>	lacF PTS system lactose-specific enzyme IIA	42,68
CAC2968		Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	5,56
CAC2984		hypothetical protein	3,75
CAC3002		Uncharacterized conserved protein, YHJR B.subtilis family	4,48
CAC3081		Spore-cortex-lytic enzyme, SLEB	5,12
CAC3214		Stage V sporulation protein T, AbrB family transcriptional regulator	3,11
CAC3240		Predicted membrane protein	3,41
CAC3241		Uncharacterized conserved membrane protein, YYAD B.subtilis ortholog	3,10
CAC3244		Spore cortex-lytic enzyme, pre-pro-form (diverged form of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase), peptidoglycan-binding domain	5,86
CAC3278		Uncharacterized protein, containing cell adhesion domain and ChW-repeats	5,00
CAC3307		TPR-repeats containing protein	3,45
CAC3308		Glycosyltransferase fused to TPR-repeat domain	3,55
CAC3309		Predicted membrane protein	6,16
CAC3310		Predicted UDP-glucose 6-dehydrogenase	4,03
CAC3311		TPR-repeat domain fused to glycosyltransferase	3,34
CAC3312		hypothetical protein	3,59
CAC3313		Acyl carrier protein, ACP	3,62
CAC3318		hypothetical protein	3,56
CAC3357		hypothetical protein	3,52
CAC3416		Uncharacterized protein, homolog of YYBI B.subtilis fused to uncharacterized domain similar to A.thaliana (gi 3292817 and 5002526)	5,18
CAC3421		Acyl carrier protein phosphodiesterase	3,94
CAC3450		hypothetical protein	5,42
CAC3521		hypothetical protein	3,48
CAC3540		hypothetical protein	3,75
CAC3621	<i>fer</i>	fer Ferredoxin	3,03

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A21: Gene mit einer signifikant reprimierten Expression in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* bei pH 4,5. RNA Proben wurden von solventogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant reprimiert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältnis (Ratio) $\leq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0004		Cysteine protease	-9,26
CAP0036		Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of B.subtilis	-294,47

CAP0037	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of B.subtilis	-115,30
CAP0044	hypothetical protein	-7,70
CAP0045	Glycosyl transferase	-9,61
CAP0053	xynb Xylanase, glycosyl hydrolase family 10	-3,57
CAP0054	Xylanase/chitin deacetylase family enzyme	-3,30
CAP0056	pell Pectate lyase, secreted, polysaccharide lyase family	-3,49
CAP0065	Predicted secreted metalloprotease	-8,85
CAP0098	amyA alpha-amylase	-5,70
CAP0151	Integrin-like repeats domain fused to lysozyme, LYCV glycosyl hydrolase	-9,43
CAP0152	Hypothetical protein, CF-6 family	-12,63
CAP0162	adhe1 Aldehyde dehydrogenase (NAD+)	-19,57
CAP0163	ctfa Butyrate-acetoacetate COA-transferase subunit A	-20,89
CAP0164	ctfb Butyrate-acetoacetate COA-transferase subunit B	-15,05
CAP0168	amyA Alpha-amylase	-4,79
CAC0252	Molybdate-binding protein	-4,67
CAC0253	nifH Nitrogenase iron protein (nitrogenase component II) gene nifH	-5,63
CAC0254	nifHD Nitrogen regulatory protein PII (nitrogen fixation nifHD)	-8,33
CAC0255	nifHD Nitrogen regulatory protein PII (nitrogen fixation nifHD)	-6,55
CAC0256	nifD Nitrogenase molybdenum-iron protein, alpha chain (nitrogenase component I) gene nifD	-7,92
CAC0258	nifE Nitrogenase iron-molibdenum cofactor biosynthesis protein, gene nifE	-3,60
CAC0259	Fusion nifN/K+nifB (nifN-nitrogenase iron molybdenum cofactor biosynthesis protein, nifK-nitrogenase molibdenum-iron protein beta chain, nifB-nitrogenase iron-molibdenum cofactor biosynthesis protein)	-4,44
CAC0264	Predicted membrane protein	-4,24
CAC0304	motA Chemotaxis motility protein A, gene motA	-9,82
CAC0305	motB Chemotaxis motility protein B, gene motB	-7,72
CAC0328	Predicted metal-dependent hydrolase	-3,94
CAC0332	manB Beta-mannanase	-3,77
CAC0495	thiC Thiamine monophosphate syntase	-8,23
CAC0496	Uncharacterized conserved protein, YitT family	-7,33
CAC0542	Methyl-accepting chemotaxis protein	-4,57
CAC0561	Cellulase CelE ortholog, dockerin domain	-4,75
CAC0574	Pectate lyase H (FS)	-4,03
CAC0626	trpS tryptophanyl-tRNA synthetase	-5,38
CAC0682	nrgA Ammonium transporter (membrane protein nrgA)	-3,25
CAC0717	Predicted membrane protein	-5,78
CAC0727	yifK Amino acid permease, gene yifK	-6,32
CAC0826	Endoglucanase family 5	-3,61
CAC0829	Uncharacterized conserved membrane protein, similar to MDR (VANZ) ORF of Enterococcus	-6,27
CAC0834	Predicted integral membrane protein	-3,25
CAC0843	Ribonuclease precursor (barnase), secreted.	-3,26
CAC0844	Barstar-like protein ribonuclease (barnase) inhibitor	-3,58
CAC0877	cfa Cyclopropane fatty acid synthase	-3,83
CAC0893	Prephenate dehydrogenase	-3,43
CAC0894	aroB 3-dehydroquinate synthetase	-3,70

CAC0895	aroA 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	-3,46
CAC0896	aroC chorismate synthase	-3,52
CAC0897	aro Fusion chorismate mutase and shikimate 5-dehydrogenase	-3,26
CAC0898	aroK Shikimate kinase	-3,34
CAC0910	Probably cellulosomal scaffolding protein precursor, secreted, cellulose-binding and cohesin domain	-27,77
CAC0911	Possible processive endoglucanase family 48, secreted, CelF ortholog, dockerin domain	-24,52
CAC0912	Possible non-processive endoglucanase family 5, secreted, CelA homolog secreted, dockerin domain	-30,44
CAC0913	Possible non-processive endoglucanase family 9, secreted, CelG ortholog, dockerin and cellulose-binding domain	-21,43
CAC0914	Cellulosome integrating cohesin-containing protein, secreted	-24,98
CAC0915	Endoglucanase A precursor (endo-1,4-beta-glucanase) (cellulase A), secreted, dockerin domain	-9,55
CAC0916	Possible non-processive endoglucanase family 9, secreted, CelG ortholog, dockerin and cellulose-binding domain	-21,22
CAC0917	and cellulose-binding endoglucanase family 9, CelL ortholog, dockerin domain	-24,40
CAC0918	Possible non-processive endoglucanase family 5, ortholog of mannase A, secreted, dockerin domain	-21,97
CAC0919	Probably secreted sialidase, several ASP-boxes and dockerin domain	-13,61
CAC0948	Uncharacterized protein, DegV family	-3,66
CAC0949	Predicted transcriptional regulator	-3,65
CAC0950	Predicted membrane protein	-3,26
CAC0998	Homoserine dehydrogenase	-6,04
CAC0999	thrC threonine synthase	-6,72
CAC1000	Uncharacterized protein, homolog of yhfF B.subtilis	-6,34
CAC1107	Hypothetical protein, CF-36 family	-3,12
CAC1130	hypothetical protein	-6,76
CAC1132	hypothetical protein	-6,17
CAC1179	hypothetical protein	-4,22
CAC1233	chev Chemotaxis protein CheV ortholog (CheW-like adaptor domain and CheY-like reciever domain)	-10,16
CAC1433	hypothetical protein	-3,39
CAC1529	Beta-xylosidase, family 43 glycosyl hydrolase	-3,20
CAC1555	Flagellin	-6,84
CAC1579	Methyl-accepting chemotaxis-like protein (chemotaxis sensory transducer)	-3,49
CAC1580	hypothetical protein	-3,41
CAC1600	Methyl-accepting chemotaxis-like protein (chemotaxis sensory transducer)	-8,32
CAC1601	Methyl-accepting chemotaxis-like protein (chemotaxis sensory transducer)	-7,37
CAC1634	Flagellin	-91,31
CAC1883	Uncharacterized phage related protein	-3,07
CAC1889	Uncharacterized phage related protein	-5,26
CAC1892	hypothetical protein	-5,16
CAC1893	ClpP family serine protease, possible phage related	-4,85
CAC1894	Phage-related, head portal protein	-7,31
CAC1895	Phage terminase-like protein, large subunit	-3,65

CAC1916	hypothetical protein	-3,48
CAC1917	hypothetical protein	-4,17
CAC1918	hypothetical protein	-3,21
CAC1929	hypothetical protein	-3,03
CAC2166	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	-3,16
CAC2167	Flagellin family protein	-3,12
CAC2183	Uncharacterized protein, posible homoloh of YJFB B. subtilis	-3,96
CAC2185	hypothetical protein	-5,27
CAC2202	hypothetical protein	-3,13
CAC2203	hag Possible hook-associated protein, flagellin family	-29,21
CAC2204	hypothetical protein	-3,67
CAC2205	fliD Flagellar hook-associated protein FliD	-4,27
CAC2206	fliS Flagellar protein FliS	-4,29
CAC2207	hypothetical protein	-4,06
CAC2208	Flagellin family protein, YVYC B.subtilis ortholog	-4,61
CAC2209	csrA Carbon storage regulator, csrA	-4,49
CAC2210	Uncharacterized protein, YVIF B.subtilis homolog	-5,62
CAC2211	flgL Flagellin	-5,78
CAC2212	FlgK Flagellar hook-associated protein FlgK	-6,24
CAC2213	hypothetical protein	-5,19
CAC2214	flgM Regulator of flagellin synthesis, FLGM	-5,08
CAC2252	Alpha-glucosidase fused to unknown alpha-amylase C-terminal. domain	-4,99
CAC2362	thrS threonyl-tRNA synthetase	-3,16
CAC2404	Glycosyltransferase	-4,51
CAC2405	Predicted glycosyltransferase	-4,43
CAC2406	Predicted permease, possible O-antigen transporter	-3,92
CAC2407	CheY-like receiver domain of response regulator	-3,82
CAC2408	Glycosyltransferase	-3,22
CAC2517	nrpE Extracellular neutral metalloprotease, NPPE	-3,75
CAC2708	hbd 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	-4,06
CAC2891	Fusion of alpha-glucosidase (family 31 glycosyl hydrolase) and glycosidase (TreA/MalS family)	-3,49
CAC3157	trpA Tryptophan synthase alpha chain	-6,25
CAC3158	trpB tryptophan synthase subunit beta	-6,96
CAC3159	trpF Phosphoribosylanthranilate isomerase	-10,73
CAC3160	trpC Indole-3-glycerol phosphate synthase	-11,13
CAC3161	trpD Anthranilate phosphoribosyltransferase	-16,25
CAC3162	pabA Para-aminobenzoate synthase component II	-13,86
CAC3163	parB anthranilate synthase component I	-13,81
CAC3352	Membrane associated methyl-accepting chemotaxis protein with HAMP domain	-3,85
CAC3465	Amidase from nicotinamidase family	-3,13
CAC3469	Endoglucanase family 5, S-layer homology, cell-adhesion and dockerin domains	-7,04
CAC3515	Alpha/beta superfamily hydrolase (possible peptidase)	-4,32
CAC3526	FMN-binding protein	-4,01
CAC3527	Ferredoxin	-4,54
CAC3556	Probable S-layer protein	-90,91

CAC3558

Probable S-layer protein

-91,46

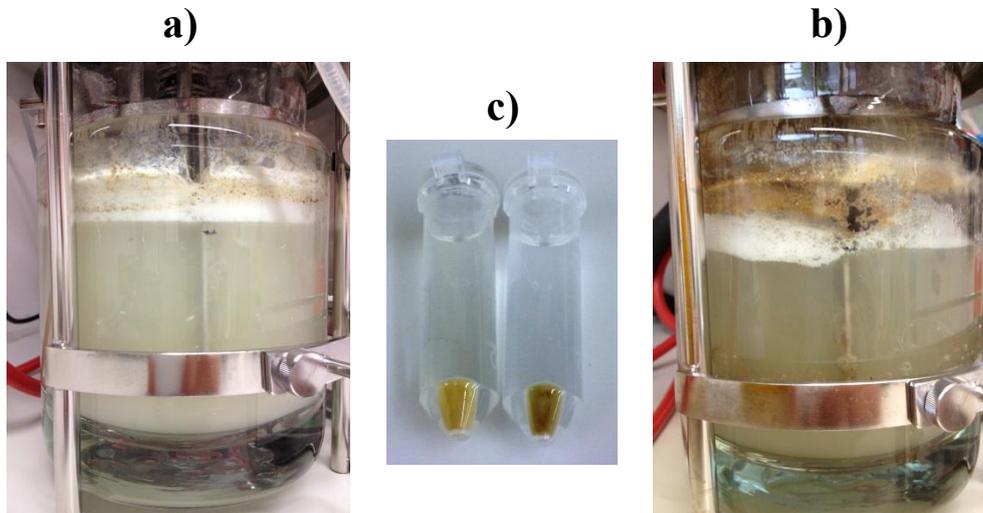
^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Abbildung A37: Kultivierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* in einem Chemostaten. Dargestellt sind die jeweiligen 1l-Bioreaktoren ca. 48h nach einem pH-induzierten „shift“ von der Acidogenese (pH 5,7) zur Solventogenese (pH 4,5) sowie ein sedimentiertes Zellpellet beider Kulturen (c).

Tabelle A22: Gene mit einer signifikanten Induktion des Transkriptlevels in *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* bei pH 5,7. RNA Proben wurden von acidogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant induziert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältniss (Ratio) $\geq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAC0383		PTS cellobiose-specific component IIA	3,08
CAC0385		Beta-glucosidase	3,93

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A23: Gene mit einer signifikant reprimierten Expression in *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* bei pH 5,7. RNA Proben wurden von acidogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant reprimiert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältniss (Ratio) $\leq -3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0035	<i>adhE2</i>	adhe Aldehyde-alcohol dehydrogenase, ADHE1	-8,41
CAC0316	<i>argF/l</i>	argF/l Ornithine carbomoyltransferase	-5,12
CAC0495		thiC Thiamine monophosphate syntase	-8,13
CAC0496		Uncharacterized conserved protein, YitT family	-13,34
CAC0973		argG argininosuccinate synthase	-3,08
CAC0974		argH Argininosuccinate lyase	-3,75
CAC0975		Predicted P-loop kinase or ATPase distantly related to phosphoenolpyruvate carboxykinase	-3,03

CAC1886		Uncharacterized phage related protein	-3,31
CAC1887		hypothetical protein	-3,04
CAC1892		hypothetical protein	-3,44
CAC1894		Phage-related, head portal protein	-3,14
CAC2386		Predicted protein of beta-propeller fold	-3,34
CAC2388	<i>argD</i>	<i>argD</i> N-acetylornithine aminotransferase	-5,96
CAC2389	<i>argB</i>	<i>argB</i> Acetylglutamate kinase	-5,69
CAC2390	<i>argC</i>	<i>argC</i> N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-3,60
CAC2391	<i>argJ</i>	<i>argJ</i> bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	-3,82
CAC2587		GGDEF domain containing protein	-3,01
CAC2588		Glycosyltransferase	-3,18
CAC3274		Possible surface protein, responsible for cell interaction, contains cell adhesion domain and ChW-repeats	-3,29
CAC3459		Homolog of cell division GTPase FtsZ, diverged	-6,42

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A24: Gene mit einer signifikanten Induktion des Transkriptlevels in *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* bei pH 4,5. RNA Proben wurden von solventogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant induziert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältnis (Ratio) $\geq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0004		Cysteine protease	3,23
CAP0053		<i>xynb</i> Xylanase, glycosyl hydrolase family 10	3,65
CAP0054		Xylanase/chitin deacetylase family enzyme	3,60
CAP0120		Possible xylan degradation enzyme (glycosyl hydrolase family 43-like domain, cellulose-binding domain and Ricin B-like domain)	3,03
CAP0160		Secreted protein containing cell-adhesion domains	3,39
CAP0168	<i>amyA</i>	<i>amyA</i> Alpha-amylase	3,72
CAC0102		O-acetylhomoserine sulfhydrylase	168,43
CAC0103	<i>cysC</i>	<i>cysC</i> Adenylylsulfate kinase	202,12
CAC0104		adenylylsulfate reductase	285,71
CAC0105		Ferredoxin	192,15
CAC0106		ABC-type probable sulfate transporter, periplasmic binding protein	119,07
CAC0107		ABC-type sulfate transporter, ATPase component	224,49
CAC0108		ABC-type probable sulfate transporter, permease protein	97,22
CAC0109	<i>cysD</i>	<i>cysD</i> sulfate adenylyltransferase subunit 2	301,82
CAC0110	<i>cysN</i>	<i>cysN</i> GTPase, sulfate adenylate transferase subunit 1	168,90
CAC0233		PTS system, IIA component	3,31
CAC0383		PTS cellobiose-specific component IIA	5,47
CAC0384	<i>licB</i>	<i>licB</i> PTS system, cellobiose-specific component BII	5,97
CAC0385		Beta-glucosidase	5,89
CAC0386	<i>licC</i>	<i>licC</i> PTS cellobiose-specific component IIC	5,78
CAC0387		hypothetical protein	5,18
CAC0390		Cystathionine gamma-synthase	33,88
CAC0391		Cystathionine beta-lyase	24,84

CAC0561		Cellulase CelE ortholog, dockerin domain	4,45
CAC0574		Pectate lyase H (FS)	3,17
CAC0578	<i>metH</i>	metH Cobalamine-dependent methionine synthase I (methyltransferase and cobalamine-binding domain)	5,17
CAC0878		Amino acid ABC transporter permease component	7,68
CAC0879		ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component	8,38
CAC0880		Periplasmic amino acid binding protein	8,61
CAC0910		Probably cellulosomal scaffolding protein precursor, secreted, cellulose-binding and cohesin domain	6,42
CAC0911		Possible processive endoglucanase family 48, secreted, CelF ortholog, dockerin domain	6,65
CAC0912		Possible non-processive endoglucanase family 5, secreted, CelA homolog secreted, dockerin domain	8,59
CAC0913		Possible non-processive endoglucanase family 9, secreted, CelG ortholog, dockerin and cellulose-binding domain	4,93
CAC0914		Cellulosome integrating cohesin-containing protein, secreted	5,44
CAC0915		Endoglucanase A precursor (endo-1,4-beta-glucanase) (cellulase A), secreted, dockerin domain	5,31
CAC0916		Possible non-processive endoglucanase family 9, secreted, CelG ortholog, dockerin and cellulose-binding domain	5,62
CAC0917		and cellulose-binding endoglucanase family 9, CelL ortholog, dockerin domain	5,82
CAC0918		Possible non-processive endoglucanase family 5, ortholog of mannase A, secreted, dockerin domain	6,47
CAC0919		Probably secreted sialidase, several ASP-boxes and dockerin domain	6,80
CAC0929		SAM-dependent methyltransferase	25,00
CAC0930	<i>metB</i>	metB Cystathionine gamma-synthase	43,03
CAC0931		Cysteine synthase	25,32
CAC0932		hypothetical protein	37,81
CAC0933	<i>xyIR</i>	xyIR transcriptional regulator of NagC/XyIR family (xylose repressor)	11,70
CAC0984		ABC transporter, ATP-binding protein	31,29
CAC0985		ABC transporter, permease component	31,77
CAC0986		Lipoprotein, attached to the cytoplasmic membrane, NLPA family	43,78
CAC1356	<i>thiH</i>	thiH thiamine biosynthesis protein ThiH	3,35
CAC1770		sigma factor Sgil	3,10
CAC1825	<i>metB</i>	metB homoserine O-succinyltransferase	12,55
CAC1826		hypothetical protein	9,19
CAC1827		TldD-like protein fragment	7,82
CAC1970		hypothetical protein	3,68
CAC2235	<i>cysK</i>	cysK Cysteine synthase/cystathionine beta-synthase, CysK	12,17
CAC2236		Uncharacterized conserved protein of YjeB/RRF2 family	5,78
CAC2252		Alpha-glucosidase fused to unknown alpha-amylase C-terminal. domain	3,41
CAC2517		nrpE Extracellular neutral metalloprotease, NPPE	8,00
CAC2782		Predicted permease	4,68
CAC2783	<i>cysD</i>	cysD O-acetylhomoserine sulfhydrylase	29,50
CAC3325		Periplasmic amino acid binding protein	18,52
CAC3326		Amino acid ABC-type transporter, permease component	18,39
CAC3327		Amino acid ABC-type transporter, ATPase component	14,87

CAC3422	Sugar proton symporter (possible xylulose)	3,15
CAC3469	Endoglucanase family 5, S-layer homology, cell-adhesion and dockerin domains	3,82
CAC3470	hypothetical protein	3,27
CAC3509	Transcriptional regulator, MerR family (duplicated domains)	4,13
CAC3664	Predicted flavodoxin	11,57
CAC3665	Alpha/beta superfamily hydrolase	16,05

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A25: Gene mit einer signifikant reprimierten Expression in *C. acetobutylicum adhE2::int(696)* bei pH 4,5. RNA Proben wurden von solventogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant reprimiert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältniss (Ratio) $\leq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0035	<i>adhE2</i>	adhe Aldehyde-alcohol dehydrogenase, ADHE1	-3,64
CAC0316	<i>argF/I</i>	argF/I Ornithine carbomoyltransferase	-12,52
CAC0380		Periplasmic amino acid-binding protein	-8,47
CAC0495	<i>thiC</i>	thiC Thiamine monophosphate syntase	-10,64
CAC0496		Uncharacterized conserved protein, YitT family	-10,53
CAC0539	<i>manB</i>	manB Beta-mannanase ManB, contains ChW-repeats	-3,05
CAC0829		Uncharacterized conserved membrane protein, similar to MDR (VANZ) ORF of <i>Enterococcus</i>	-9,24
CAC0973	<i>argG</i>	argG argininosuccinate synthase	-11,51
CAC0974	<i>argH</i>	argH Argininosuccinate lyase	-11,57
CAC0975		Predicted P-loop kinase or ATPase distantly related to phosphoenolpyruvate carboxykinase	-6,37
CAC1130		hypothetical protein	-3,81
CAC1138		hypothetical protein	-3,92
CAC1175		Hypothetical protein, CF-35 family	-3,33
CAC1182		Phage related protein, YorG <i>B.subtilis</i> homolog	-3,02
CAC1889		Uncharacterized phage related protein	-5,82
CAC1894		Phage-related, head portal protein	-4,28
CAC2388	<i>argD</i>	argD N-acetylornithine aminotransferase	-22,51
CAC2389	<i>argB</i>	argB Acetylglutamate kinase	-14,95
CAC2390	<i>argC</i>	argC N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-11,86
CAC2391	<i>argJ</i>	argJ bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	-13,04
CAC2644	<i>carB</i>	carB Carbamoylphosphate synthase large subunit	-8,12
CAC2645	<i>carA</i>	carA carbamoyl-phosphate synthase small subunit	-7,79
CAC3019		Sensory transduction protein with GGDEF and EAL domains	-4,00
CAC3020	<i>argJ</i>	argJ bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	-5,96
CAC3058		Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	-3,79
CAC3236		Possible transcriptional regulator from YAEG/LRPR family	-3,83
CAC3237		msmX Multiple sugar-binding ABC-transporter, MSMX ATP-binding protein	-3,74
CAC3461		hypothetical protein	-3,27

CAC3515

Alpha/beta superfamily hydrolase (possible peptidase)

-4,01

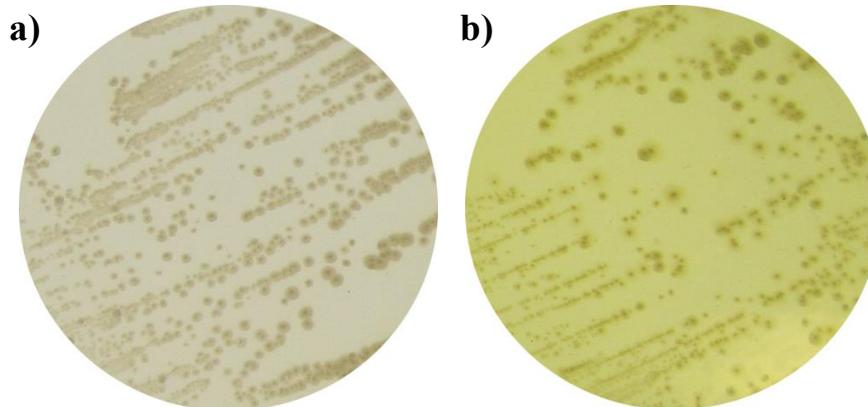
^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Abbildung A38: Kultivierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* (b) auf CGM-Agar. Beide Stämme wurden anaerob bei 37 °C für ca. 3 Tage inkubiert. Erläuterungen siehe Text (3.5.2).

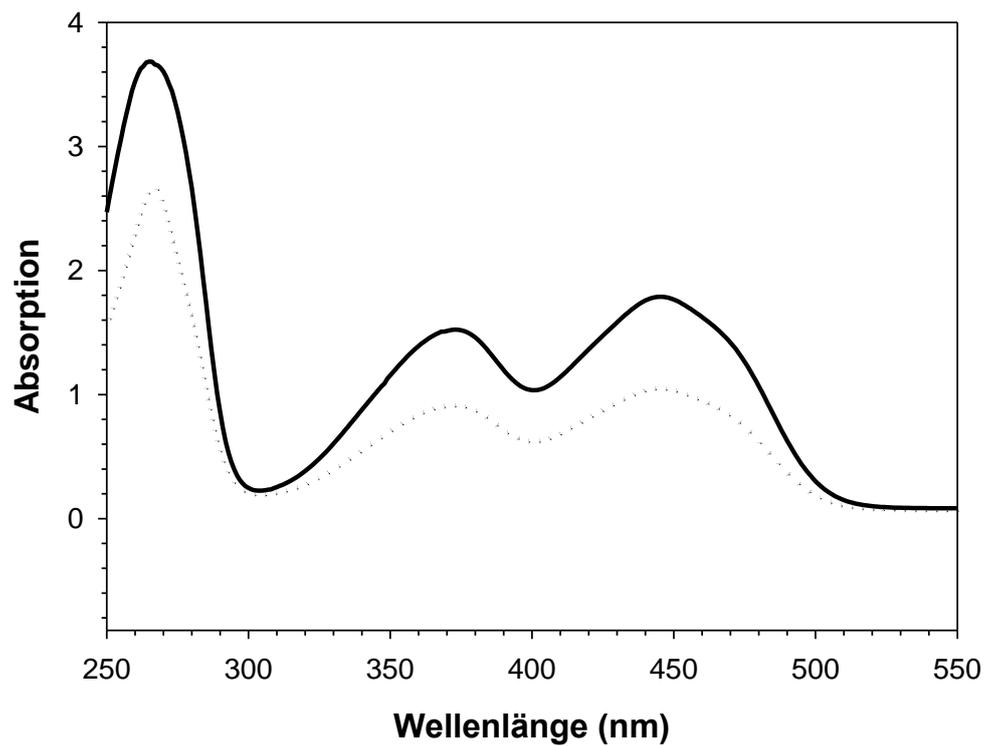


Abbildung A39: Absorptionsspektrum einer wässrigen Riboflavin-Lösung (---) und einem zellfreien Kulturüberstand von *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* (—). Erläuterungen siehe Text (3.5.2).

Tabelle A26: Batch-Fermentation in MS-MES mit Formiat. Dargestellt sind die wichtigsten Parameter der wachstumsphysiologischen Charakterisierung von *C. acetobutylicum pflA::int(60)* und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* in einer 2. Passage MS-MES, der zum Zeitpunkt $t = 0$ h unterschiedliche Konzentrationen an Formiat zugesetzt wurden. 1: 0 mM Formiat; 2: 1 mM Formiat; 3: 5 mM Formiat; 4: 10 mM Formiat. Erläuterungen siehe Text (3.5.3.1). Bei der gaschromatographischen Bestimmung der Metabolitkonzentrationen wurden interne Standards mit bekannter Konzentration mitgeführt (2.6.3).

Parameter	<i>C. ac. pflA::int(60)</i>				<i>C. ac. pflB::int(1335)</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,02	0,20	0,20	0,25	0,03	0,15	0,22	0,26
max. OD ₆₀₀	0,26	4,21	5,61	3,49	0,37	4,03	4,80	4,44
max. Acetat (mM)	1,87	24,35	27,99	22,08	2,31	22,82	28,32	21,17
max. Butyrat (mM)	2,10	35,09	32,47	27,62	1,81	31,09	33,33	27,81
max. Aceton (mM)	0	69,03	77,38	59,46	0	84,33	93,81	73,89
max. Butanol (mM)	0	97,42	105,16	91,33	0	115,69	118,04	109,35
max. Ethanol (mM)	0,95	15,34	21,13	12,65	1,18	13,71	24,85	16,16
ABE (g/l)	0,04	11,93	13,25	10,80	0,05	14,09	15,33	13,13
Riboflavin (μ M)	-	0,43	0,75	0,91	-	44,06	92,73	82,86

Tabelle A27: Batch-Fermentation in MS-MES mit Nukleosiden. Dargestellt sind die wichtigsten Parameter der wachstumsphysiologischen Charakterisierung von *C. acetobutylicum pflA::int(60)* und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* in einer 2. Passage MS-MES, die zum Zeitpunkt $t = 0$ h mit unterschiedlichen Medienzusätzen versehen wurde. 1: 0 ohne Zusätze; 2: 1 mM Formiat; 3: 1 mM Adenosin, 1 mM Guanosin; 4: 1 mM Cytidin, 1 mM Thymidin, 1 mM Uridin. Erläuterungen siehe Text (3.5.3.2).

Parameter	<i>C. ac. pflA::int(60)</i>				<i>C. ac. pflB::int(1335)</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,01	0,27	0,30	0,03	0,01	0,29	0,33	0,02
max. OD ₆₀₀	0,28	4,30	4,83	0,49	0,31	4,52	5,25	0,55
max. Acetat (mM)	1,33	19,88	17,37	2,49	1,76	25,91	23,13	2,14
max. Butyrat (mM)	1,49	25,53	21,06	1,55	1,59	32,44	27,87	1,89
max. Aceton (mM)	0	71,44	64,33	0	0	84,33	75,62	0
max. Butanol (mM)	0	105,70	100,14	0	0	115,69	115,43	0
max. Ethanol (mM)	0,98	18,07	24,03	1,14	0,11	21,73	23,03	1,42
ABE (g/l)	0,04	12,80	12,25	0,05	0,01	14,46	13,94	0,07
Riboflavin (μ M)	-	0,29	0,45	0,33	-	60,13	119,04	0,52

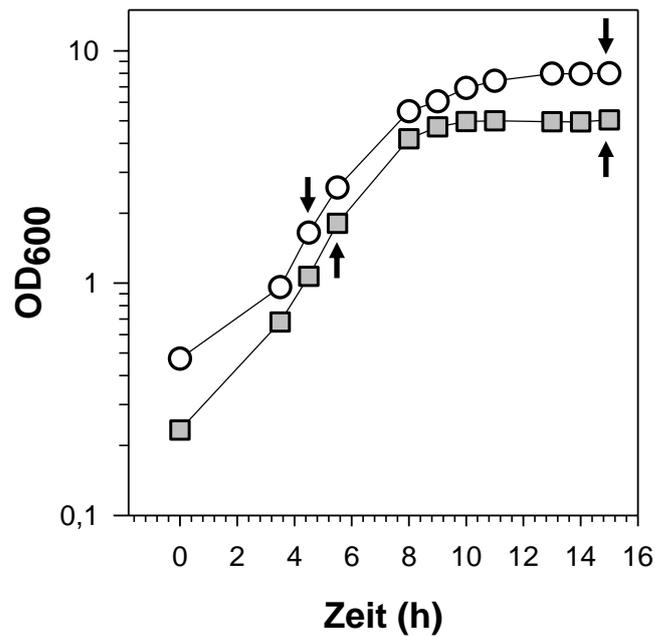


Abbildung A40: Wachstum von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (○) und *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* (■). Die Kultivierung der Stämme erfolgte anaerob bei 37 °C in 250 ml CGM mit 1 mM Formiat. Die Pfeile (↓) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für DNA Microarray Analysen.

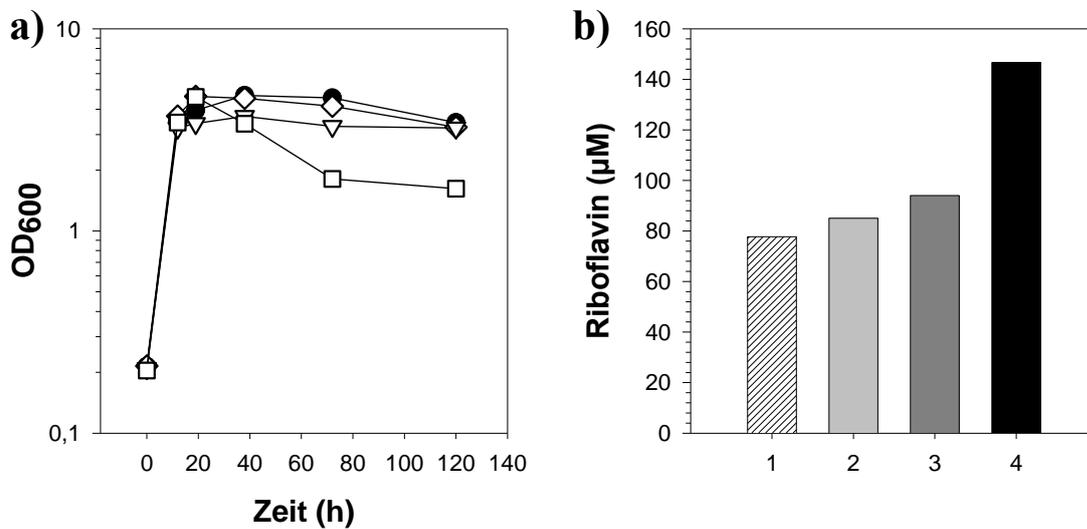


Abbildung A41: Wachstum von *C. acetobutylicum pflB::int(1335)* in Gegenwart von 1 mM Formiat und unterschiedlichen Konzentrationen an FMN. (a) Dargestellt ist die 2. Passage einer Batch-Fermentation in 100 ml MS-MES Medium. Die Medienzusätze wurden den Kulturen zum Zeitpunkt $t = 0$ h beigefügt. Die nach 120 h im zellfreien Mediumüberstand der *pflB*-Integrate bestimmten Konzentrationen an produziertem Riboflavin sind in (b) dargestellt. ●, 1: 0 μM FMN; ◇, 2: 10 μM FMN; ▽, 3: 20 μM FMN; □, 4: 50 μM FMN.

Tabelle A28: Gene mit einer signifikanten Induktion des Transkriptlevels in *C. acetobutylicum pdc::int(843)* bei pH 5,7. RNA Proben wurden von acidogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant induziert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältniss (Ratio) $\geq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0057		Putative glycoprotein or S-layer protein	4,47
CAP0058		Rare lipoprotein A RLPA related protein	4,40
CAC0392		Peptidoglycan-binding domain	3,30
CAC0570		PTS enzyme II, ABC component	33,42
CAC1072		Fe-S oxidoreductase	3,38
CAC1775		Predicted membrane protein	3,05
CAC2689		Uncharacterized protein, YJCM B.subtilis ortholog	9,19
CAC2951	<i>lacC</i>	lacC Tagatose-6-phosphate kinase	9,74
CAC2952	<i>gatY</i>	gatY tagatose 1,6-diphosphate aldolase	20,19
CAC2953	<i>lacB</i>	lacB galactose-6-phosphate isomerase	17,25
CAC2954	<i>lacA</i>	lacA galactose-6-phosphate isomerase	26,42
CAC2955	<i>lacR</i>	lacR Lactose phosphotransferase system repressor lacR	12,04
CAC2956		PTS system enzyme IIC component (galactitol/fructose specific)	64,73
CAC2957		PTS system IIB component (galactitol/fructose specific)	117,23
CAC2958		PTS system enzyme IIBC component (galactitol/fructose specific)	49,76
CAC3412		Predicted protein-S-isoprenylcysteine methyltransferase	3,28
CAC3612		hypothetical protein	3,85

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A29: Gene mit einer signifikant reprimierten Expression in *C. acetobutylicum pdc::int(843)* bei pH 5,7. RNA Proben wurden von acidogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant reprimiert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältniss (Ratio) $\leq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0025	<i>pdc</i>	pdc Pyruvate decarboxylase	-5,60
CAP0026		hypothetical protein	-3,76
CAC0117		protein cheY homolog	-3,71
CAC0118	<i>cheA</i>	cheA Chemotaxis protein cheA	-3,31
CAC0119	<i>cheW</i>	cheW Chemotaxis protein cheW	-3,41
CAC0120		Membrane-associated methyl-accepting chemotaxis protein with HAMP domain	-3,81
CAC0121	<i>cheR</i>	cheR Chemotaxis protein methyltransferase (cheR)	-3,34
CAC0383		PTS cellobiose-specific component IIA	-17,71
CAC0384	<i>licB</i>	licB PTS system, cellobiose-specific component BII	-49,87
CAC0385		Beta-glucosidase	-48,61
CAC0386	<i>licC</i>	licC PTS cellobiose-specific component IIC	-33,20
CAC0387		hypothetical protein	-23,48
CAC1351		Periplasmic sugar-binding protein	-4,92
CAC1352		Membrane associated chemotaxis sensory transducer protein (MSP domain and HAMP domain)	-4,84

CAC1353	Phosphotransferase system IIC component, possibly N-acetylglucosamine-specific	-14,81
CAC1862	hypothetical protein	-3,15
CAC2525	hypothetical protein	-3,83
CAC2533	Protein containing ChW-repeats	-4,21
CAC2591	Hypothetical protein, CF-41 family	-3,83
CAC2772	Permease	-4,86
CAC3057	Glycosyltransferase	-3,57
CAC3058	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	-3,39
CAC3459	Homolog of cell division GTPase FtsZ, diverged	-4,46

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A30: Gene mit einer signifikanten Induktion des Transkriptlevels in *C. acetobutylicum* *pdcc::int(843)* bei pH 4,5. RNA Proben wurden von solventogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant induziert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältnis (Ratio) $\geq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0130		hypothetical protein	6,97
CAP0141	<i>mbhs</i>	mbhs Periplasmic hydrogenase small subunit, dehydrogenase	4,90
CAP0142	<i>mbhl</i>	mbhl Periplasmic hydrogenase large subunit, dehydrogenase	5,45
CAP0143		Hydrogenase maturation protease delta subunit, HyaD-like	5,06
CAP0144		Possible steroid binding protein	4,15
CAP0145		Hypothetical protein, CF-29 family	4,09
CAP0146		HypF homolog	5,19
CAC0014		Aminotransferase	36,12
CAC0015	<i>serA</i>	serA D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	42,23
CAC0016		Related to HTH domain of SpoOJ/ParA/ParB/repB family, involved in chromosome partitioning	33,71
CAC0017	<i>serS</i>	serS seryl-tRNA synthetase	46,71
CAC0018		Putative NADPH-quinone reductase, YabF family	6,48
CAC0110	<i>cysN</i>	cysN GTPase, sulfate adenylate transferase subunit 1	3,03
CAC0213		Protein containing LysM motif repeat	4,37
CAC0243		Predicted permease	3,44
CAC0276		Uncharacterized possible metal-binding protein	4,26
CAC0469	<i>spmA</i>	spmA Spore maturation protein A (gene spmA)	5,61
CAC0470	<i>spmB</i>	spmB Spore maturation protein B (gene spmB)	4,07
CAC0546		Uncharacterized membrane protein, homolog of Methanobacterium (2621593)	3,79
CAC0570		PTS enzyme II, ABC component	23,05
CAC0579	<i>prkA</i>	prkA Serine protein kinase (prkA protein), P-loop containing	4,60
CAC0580		hypothetical protein	5,32
CAC0581	<i>spoVR</i>	spoVR Stage V sporulation protein R	4,06
CAC0613		Spore coat protein F	4,39
CAC0614		Spore coat protein F	4,16
CAC0623		hypothetical protein	4,78
CAC0646	<i>leuS</i>	leuS leucyl-tRNA synthetase	3,69
CAC0808	<i>hybG</i>	hybG Hydrogenase expression factor (hybG)	4,02

CAC0846		Hypothetical protein, CF-29 family	3,42
CAC1093		Hypothetical secreted protein	3,58
CAC1236		hypothetical protein	5,38
CAC1252		Possible membrane metalloendopeptidase	3,53
CAC1253		Sporulation protein IVFB related protein, predicted metallopeptidase	3,59
CAC1276	<i>SpolIP</i>	SpolIP Stage II sporulation protein P	5,49
CAC1298		Uncharacterized protein, related to B.subtilis spore coat protein COTS	3,99
CAC1336		hypothetical protein	3,82
CAC1337		Spore coat protein COTJB	3,72
CAC1338		Spore coat protein COTJC	5,53
CAC1347		transaldolase	3,98
CAC1348		Transketolase, TKT	4,05
CAC1349	<i>galM</i>	galM Aldose-1-epimerase	3,72
CAC1402		Uncharacterized conserved protein, similar to IcaC of Staphylococcus, YHJR B.subtilis family	3,44
CAC1457		PTS system, fructose(mannose)-specific IIA component	14,21
CAC1458		PTS system, fructose(mannose)-specific IIB	14,97
CAC1459		PTS system, fructose(mannose)-specific IIC	10,31
CAC1460		PTS system, fructose(mannose)-specific IID	12,87
CAC1461		Predicted membrane protein	10,45
CAC1633		Protein from bacterioferritin family	5,36
CAC1695	<i>sigE</i>	sigE sporulation sigma factor SigE	4,38
CAC1696	<i>sigG</i>	sigG sporulation sigma factor SigG	3,75
CAC1697		Uncharacterized conserved protein, YMXH B.subtilis homolog	4,29
CAC1974		Hypothetical secreted protein	4,71
CAC1977		Predicted membrane protein	3,84
CAC1978		Predicted membrane protein	4,24
CAC1980		Predicted ATPase involved in pili biogenesis	3,77
CAC1981		hypothetical protein	4,34
CAC2044		hypothetical protein	5,18
CAC2046		Predicted membrane protein	3,60
CAC2047		Conjugative transfer gene TrsE homolog, ATPase	3,76
CAC2048		Uncharacterized secreted protein	4,33
CAC2050		Predicted membrane protein	3,44
CAC2051		Predicted membrane protein	3,75
CAC2052		DNA-dependent RNA polymerase sigma subunit	3,93
CAC2053		hypothetical protein	4,92
CAC2086		Stage III sporulation protein AH, SpolIIAH	6,37
CAC2087		Stage III sporulation protein AG, SpolIIAG	5,88
CAC2088		Stage III sporulation protein AF, SpolIIAF	5,95
CAC2089		Stage III sporulation protein AE, SpolIIAE	5,20
CAC2090		Stage III sporulation protein AD, SpolIIAD	6,02
CAC2091		Stage III sporulation protein AC, SpolIIAC	6,13
CAC2092		stage III sporulation protein SpoAB	6,35
CAC2093		Stage III sporulation protein AA, SpolIIAA	6,69
CAC2137		Cation transport P-type ATPase	4,34
CAC2239	<i>glgA</i>	glgA Glycogen synthase, glgA	3,56

CAC2240		Protein shares with cyclomaltodextrin glucanotransferase C-terminal domain	4,36
CAC2342		Predicted membrane protein	3,86
CAC2352		hypothetical protein	6,71
CAC2353		hypothetical protein	5,64
CAC2354		Nifs family aminotransferase	5,06
CAC2365	<i>sspA</i>	<i>sspA</i> Small acid-soluble spore protein	3,85
CAC2383		Predicted xylanase/chitin deacetylase	5,40
CAC2416		Uncharacterized protein, ErfK family, contains peptidoglycan-binding domain	3,40
CAC2615		Uncharacterized conserved protein, CotF B.subtilis family	4,07
CAC2616		Predicted iron-dependent transcription repressor	4,58
CAC2666		hypothetical protein	4,18
CAC2689		Uncharacterized protein, YJCM B.subtilis ortholog	6,13
CAC2728		Hypothetical protein, CF-30 family	4,68
CAC2747		Protein containing LysM repeats (N-terminal domain) and domain related to chitinase	3,11
CAC2776		hypothetical protein	3,13
CAC2781		hypothetical protein	3,72
CAC2791		MoaA/NirJ family Fe-S oxidoreductase	3,66
CAC2793		Transcriptional regulator, Lrp family (possible nitrite reductase regulator NirD)	3,86
CAC2794		Transcriptional regulator, Lrp family (possible nitrite reductase regulator NirD)	3,80
CAC2795		MoaA/NirJ family Fe-S oxidoreductase	4,63
CAC2800		CotJC-like protein (GS80 family)	3,41
CAC2843		Protein containing aminopeptidase domain (iap family)	3,77
CAC2859	<i>spolIID</i>	<i>spolIID</i> Stage III sporulation protein D, SpolIID	4,68
CAC2860		hypothetical protein	5,01
CAC2903		LysM domain containing membrane protein	5,38
CAC2905		Uncharacterized protein, YABG B.subtilis ortholog	4,10
CAC2906		Spore coat protein <i>cotS</i> related	6,46
CAC2951	<i>lagC</i>	<i>lacC</i> Tagatose-6-phosphate kinase	4,86
CAC2952	<i>gatY</i>	<i>gatY</i> tagatose 1,6-diphosphate aldolase	6,00
CAC2953	<i>lacB</i>	<i>lacB</i> galactose-6-phosphate isomerase	3,99
CAC2954	<i>lacA</i>	<i>lacA</i> galactose-6-phosphate isomerase	6,63
CAC2955	<i>lacR</i>	<i>lacR</i> Lactose phosphotransferase system repressor <i>lacR</i>	5,49
CAC2956		PTS system enzyme IIC component (galactitol/fructose specific)	24,08
CAC2957		PTS system IIB component (galactitol/fructose specific)	30,42
CAC2958		PTS system enzyme IIBC component (galactitol/fructose specific)	13,04
CAC2984		hypothetical protein	3,94
CAC3002		Uncharacterized conserved protein, YHJR B.subtilis family	3,20
CAC3080		hypothetical protein	3,19
CAC3081		Spore-cortex-lytic enzyme, SLEB	4,86
CAC3179		Oligopeptide ABC transporter, periplasmic binding component	3,57
CAC3230		Hydrogenase subunit (ferredoxin)	3,38
CAC3241		Uncharacterized conserved membrane protein, YYAD B.subtilis ortholog	3,10
CAC3244		Spore cortex-lytic enzyme, pre-pro-form (diverged form of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase), peptidoglycan-binding domain	4,88
CAC3273		Possible surface protein, responsible for cell interaction, contains cell adhesion domain and ChW-repeats	3,12

CAC3278	Uncharacterized protein, containing cell adhesion domain and ChW-repeats	7,15
CAC3307	TPR-repeats containing protein	3,15
CAC3309	Predicted membrane protein	3,11
CAC3317	Spore coat protein F (CotF) family protein	3,01
CAC3421	Acyl carrier protein phosphodiesterase	5,06
CAC3540	hypothetical protein	3,54

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

Tabelle A31: Gene mit einer signifikant reprimierten Expression in *C. acetobutylicum* *pdcc::int(843)* bei pH 4,5. RNA Proben wurden von solventogenen *steady state* Zellen entnommen und mit entsprechenden RNA-Isolaten des Referenzstamms ATCC 824 hybridisiert. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant reprimiert gelten alle Gene, die ein Expressionsverhältniss (Ratio) $\leq 3,0$ im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

ORF	Gen	Proteinfunktion ^a	Ratio
CAP0025	<i>pdcc</i>	<i>pdcc</i> Pyruvate decarboxylase	-4,60
CAP0026		hypothetical protein	-4,49
CAC0253	<i>nifH</i>	<i>nifH</i> Nitrogenase iron protein (nitrogenase component II) gene <i>nifH</i>	-3,35
CAC0254	<i>nifHD</i>	<i>nifHD</i> Nitrogen regulatory protein PII (nitrogen fixation <i>nifHD</i>)	-4,19
CAC0255	<i>nifHD</i>	<i>nifHD</i> Nitrogen regulatory protein PII (nitrogen fixation <i>nifHD</i>)	-3,61
CAC0256	<i>nifD</i>	<i>nifD</i> Nitrogenase molybdenum-iron protein, alpha chain (nitrogenase component I) gene <i>nifD</i>	-4,33
CAC0383		PTS cellobiose-specific component IIA	-19,88
CAC0384	<i>licB</i>	<i>licB</i> PTS system, cellobiose-specific component BII	-26,96
CAC0385		Beta-glucosidase	-35,48
CAC0386	<i>licC</i>	<i>licC</i> PTS cellobiose-specific component IIC	-10,70
CAC0387		hypothetical protein	-13,72
CAC1079		Uncharacterized protein, related to enterotoxins of other Clostridiales	-3,08
CAC1821	<i>purB</i>	<i>purB</i> adenylosuccinate lyase	-3,27
CAC1884		hypothetical protein	-3,34
CAC1885		hypothetical protein	-5,21
CAC1886		Uncharacterized phage related protein	-4,94
CAC1889		Uncharacterized phage related protein	-6,24
CAC1890		Phage related protein, possible DNA packing	-3,39
CAC1893		ClpP family serine protease, possible phage related	-4,88
CAC1894		Phage-related, head portal protein	-5,42
CAC1898		hypothetical protein	-4,32
CAC1901		hypothetical protein	-3,25
CAC1902		hypothetical protein	-3,28
CAC1903		hypothetical protein	-3,21
CAC1905		hypothetical protein	-4,82
CAC1918		hypothetical protein	-3,15
CAC1946		Phage related transcriptional regulator (Xre family)	-3,60
CAC2613	<i>glcK</i>	<i>glcK</i> Transcriptional regulators of NagC/XylR family	-3,12
CAC2873	<i>thIA</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	-3,04
CAC2891		Fusion of alpha-glucosidase (family 31 glycosyl hydrolase) and glycosidase (TreA/MalS family)	-3,60
CAC2959	<i>galK</i>	<i>galK</i> galactokinase	-3,62

CAC2960	GalE UDP-galactose 4-epimerase	-4,08
CAC3633	hypothetical protein	-3,36

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001)

9. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Möglichkeit meine Dissertation an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können und die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Erwin Grill und Herrn Prof. Dr. Rudi F. Vogel möchte ich für die Übernahme des Vorsitzes bzw. Zweitprüfers in meiner Promotion danken.

Herrn Dr. Armin Ehrenreich danke ich für die Bereitstellung des sehr interessanten und abwechslungsreichen Themas sowie die daraus resultierenden zahlreichen fachlichen Diskussionen. Vielen Dank für das Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit und die Durchsicht meiner Veröffentlichungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Tina Lütke-Eversloh für die angenehme Zusammenarbeit, die ständige Gesprächsbereitschaft und die unzähligen Ideen bedanken.

Ich danke Frau Dr. Dörte Lehmann für die Bereitstellung der von ihr generierten Integrationsmutanten.

Den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Mikrobiologie der TU München, insbesondere meinen Laborkollegen der AG Ehrenreich Anja, Claudia, Melanie, Björn, Justyna, David, Désirée, Michael, Liu, Xu, Hedwig und Markus danke ich für Hilfestellungen jeglicher Art, das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit.

Ein großes Dankeschön richtet sich an Beni und Björn. Ich danke euch für die zahllosen Gespräche und die motivierenden Worte wenn es mal nicht so rund lief. Angel danke ich für das stetige Interesse an meiner Arbeit und seine Fähigkeit einfache Lösungen zu sehen, wenn man selbst um tausend Ecken denkt.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Trang, die mir in den vergangenen Jahren mit viel Liebe und Unterstützung stets zur Seite stand. Danke für die gemeinsame Zeit und deine vielen aufbauenden Worte, vor allem in der „Schreibphase“.

Mein größter Dank gebührt meiner Familie für den jahrelangen Rückhalt in jeder Lebenslage und die moralische sowie finanzielle Unterstützung. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Ohne euch wäre ich heute nicht da wo ich jetzt bin!

Schließlich möchte ich auch allen hier nicht genannten danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

10. Lebenslauf

02/2010 – 12/2013 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Promotion) am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München**

Thema: Charakterisierung von Mutanten im Lösungsmittelstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*

(Prof. Dr. Wolfgang Liebl, AG Dr. Armin Ehrenreich)

10/2003 – 11/2009 **Biologiestudium an der Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Biowissenschaften**

Diplomarbeit: Vergleichende Gentranskriptionsanalysen zur Butanolproduktion von *Clostridium acetobutylicum*

(Prof. Dr. Hubert Bahl, Dr. Tina Lütke-Eversloh)

Schwerpunkte:

- Mikrobiologie
- Molekularbiologie
- Medizinische Mikrobiologie
- Genetik

10/2002 – 06/2003 **Militärdienst im Panzergrenadierbataillon 182, Bad Segeberg**

09/1993 – 06/2002 **Erasmus-Gymnasium, Rostock**

Allgemeine Hochschulreife

Leistungskurse: Biologie, Englisch

09/1989 – 07/1993 **7. Grundschule, Rostock**

06.01.1983 **Geburt in Rostock**