

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Einfluss der Redox-Balance auf die Solventogenese
in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

Désirée Krauß

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. C. Schwechheimer

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

Die Dissertation wurde am 20.06.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.09.2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 und seine biotechnologische Relevanz.....	2
1.2 Hydrogenasen in <i>C. acetobutylicum</i>	7
1.3 Inaktivierung und Modifikation der Enzym-Aktivität.....	11
1.4 Ziele der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Organismen und Plasmide.....	17
2.2 Nährmedien und ihre fakultativen Zusätze.....	23
2.2.1 Komplexmedien.....	23
2.2.2 Definierte Medien.....	24
2.2.3 Medienzusätze.....	25
2.3 Zellanzucht, Stammhaltung und Reinheitskontrolle.....	25
2.3.1 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i> aus der Stammkultur.....	25
2.3.2 Zellanzucht in Flüssigkulturen.....	26
2.3.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in <i>C. acetobutylicum</i>	26
2.3.4 Zellanzucht von <i>Escherichia coli</i>	27
2.3.5 Stammhaltung.....	27
2.3.6 Reinheitskontrolle.....	27
2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA.....	28
2.4.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen.....	28
2.4.2 Präparation und Nachweis von DNA.....	28
2.4.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i> (Bertram and Dürre, 1989; mod.).....	29
2.4.2.2 Isolierung genomischer DNA mit Hilfe des „Master Pure DNA Purification Kits“ (Fa. Epicentre, Madison, U.S.A.....	30
2.4.2.3 Aufreinigung der Plasmid-DNA über Alkali/SDS-Lyse.....	31
2.4.2.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	31

Inhaltsverzeichnis

2.4.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	32
2.4.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.4.2.7	Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen.....	33
2.4.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
2.4.2.9	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	33
2.4.3	Klonierungen von DNA-Fragmenten.....	34
2.4.3.1	Restriktion und Dephosphorylierung.....	34
2.4.3.2	Ligation.....	34
2.4.3.3	„TOPO-TA“-Klonierung.....	35
2.4.3.4	Hybridisierung von DNA-Fragmenten.....	35
2.4.4	DNA-Transfer.....	37
2.4.4.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen und deren Anwendung.....	37
2.4.4.2	Elektroporation von <i>C. acetobutylicum</i>	37
2.4.4.3	Konjugation von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3.....	39
2.4.4.4	Konjugation von <i>C. acetobutylicum</i>	40
2.5	Standardtechniken für das Arbeiten mit RNA.....	41
2.5.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen.....	41
2.5.2	Isolation der RNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	42
2.5.3	DNase-Verdau.....	43
2.5.4	Extraktion und Fällung der RNA.....	44
2.5.5	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	45
2.5.6	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.5.7	Reverse Transkription.....	45
2.5.8	Northern-Blot.....	46
2.5.8.1	Erstellen der Gensonden.....	46
2.5.8.2	<i>in vitro</i> Transkription der Gensonden.....	46
2.5.8.3	Untersuchung der Markierungseffizienz.....	47
2.5.8.4	Übertragung und Detektion der RNA.....	49
2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
2.6.1	Standard-PCR.....	51
2.6.2	PCR zur Erzeugung von Northern-Blot Sonden.....	52
2.6.3	GeneSOEing-PCR.....	53
2.6.4	SOE-PCR.....	54

2.6.5	Kolonie-PCR.....	56
2.6.6	Reverse Transkription.....	56
2.7	DNA-Microarrays.....	57
2.7.1	Markierung der RNA mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Cy TM 3/Cy TM 5.....	58
2.7.2	Aufreinigung der markierten cDNA.....	59
2.7.3	Quantifizierung der markierten cDNA.....	59
2.7.4	Hybridisierung markierter cDNA.....	60
2.7.5	Analyse der DNA-Microarrays mit GenePix Pro 6.0.....	63
2.7.6	Auswertung der Transkriptionsdaten.....	64
2.8	Analyse der Kulturüberstände.....	64
2.8.1	Gas-Chromatographie.....	64
2.8.2	Bestimmung der Glukose-Konzentration.....	65
2.9	Bestimmung der H₂-Produktion.....	66
2.10	Standardtechniken für das Arbeiten mit Proteinen.....	68
2.10.1	Zellaufschluss.....	69
2.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford 1976).....	69
2.10.3	Messung der Hydrogenase-Aktivität.....	70
3.	Ergebnisse.....	72
3.1	Modifikation der Expression der Hydrogenase HydA basierend auf der Antisense-RNA Technologie.....	72
3.1.1	Konstruktion der <i>hydA</i> Antisense-RNA Vektoren.....	73
3.1.2	Überprüfung der Transkription.....	77
3.1.2.1	Detektion der Antisense-RNA der Hydrogenase HydA.....	77
3.1.2.2	Detektion der mRNA der Hydrogenase HydA.....	79
3.1.3	Quantitative Analyse der Hydrogenase HydA Aktivität.....	81
3.1.4	Quantitative Analyse der H ₂ -Produktion.....	84
3.1.4.1	Absorption von Kohlendioxid.....	85
3.1.5	Untersuchung der Fermentationsprodukte.....	86
3.1.6	Transkriptionsanalysen von <i>C. acetobutylicum</i> pDK2 und <i>C. acetobutylicum</i> pDK3.....	89
3.1.6.1	Genexpressionsanalysen von <i>C. acetobutylicum</i> pDK2 und <i>C. acetobutylicum</i> pDK3 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle <i>C. acetobutylicum</i> pSOSzero bei logarithmischem Wachstum.....	89

3.1.6.1.1	Analyse der Fermentationsprodukte von <i>C. acetobutylicum</i> pDK2 und <i>C. acetobutylicum</i> pDK3 während des logarithmischen Wachstums.....	105
3.1.6.1.2	Bestimmung der Glukose-Konzentration in Kulturen von <i>C. acetobutylicum</i> pDK3 und <i>C. acetobutylicum</i> pSOSzero Während des logarithmischen Wachstums.....	108
3.1.6.2	Genexpressionsanalysen von <i>C. acetobutylicum</i> pDK2 und <i>C. acetobutylicum</i> pDK3 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle <i>C. acetobutylicum</i> pSOSzero bei stationärem Wachstum.....	109
3.1.6.2.1	Analyse der Fermentationsprodukte von <i>C. acetobutylicum</i> pDK2 und <i>C. acetobutylicum</i> pDK3 während des stationären Wachstums.....	126
3.1.6.2.2	Bestimmung der Glukose-Konzentration in Kulturen von <i>C. acetobutylicum</i> pDK2, <i>C. acetobutylicum</i> pDK3 und <i>C. acetobutylicum</i> pSOSzero während des stationären Wachstums.....	130
3.2	Untersuchung des Wachstumsverhalten von <i>C. acetobutylicum</i> in Anwesenheit verschiedener Wachstumsinhibitoren.....	132
3.2.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von 5-Fluorouracil, Kanamycin und Tetracyclin in <i>C. acetobutylicum</i>	132
3.3	Etablierung eines markerfreien Deletionssystems in <i>C. acetobutylicum</i>.....	133
3.3.1	Die Uracil-Phosphoribosyltransferase (<i>upp</i>).....	134
3.3.2	Konstruktion der Deletionsvektoren.....	134
3.3.3	Deletion des <i>upp</i> -Gens in <i>C. acetobutylicum</i>	137
3.4	Untersuchung der Temperatursensitivität am Beispiel des Vektors pKVM1.....	141
3.4.1	Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i> unter nicht-permissiven Temperaturen.....	141
3.4.2	Temperatursensitivität im Vergleich: <i>B. licheniformis</i> MW3 vs. <i>C. acetobutylicum</i>	143

4.	Diskussion.....	146
4.1	Verminderung der H₂-Produktion durch eine verminderte Hydrogenase HydA Menge.....	146
4.2	Hydrogenase HydA: Schlüsselenzym für die Produktselektivität?.....	149
4.3	Veränderung des Transkriptionsverhalten in <i>C. acetobutylicum</i> bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität.....	153
4.4	Mutagenese-Systeme in <i>C. acetobutylicum</i>.....	173
4.5	Ausblick.....	180
5.	Zusammenfassung.....	181
6.	Literaturverzeichnis.....	183
7.	Anhang.....	204
	Danksagung.....	228
	Lebenslauf.....	229

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
asRNA	<i>antisense</i> -Ribonukleinsäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary</i>)
CGM	<i>clostridia growth media</i>
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
$\Delta E/\text{min}$	Extinktionsänderung pro Minute
Da	Dalton
dCTP	Desoxyribocytosin-5'-Triphosphat
d.h.	das heißt
DH	Dehydrogenase
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

DMSZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
Ed.	Editor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ery	Erythromycin
ET-Puffer	Elektroporations-Transfer Puffer
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
ETM-Puffer	Elektroporations-Transfer (Magnesium)-Puffer
Fa.	Firma
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
5-FU	5-Fluorouracil
g	Gramm
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hrsg.	Herausgeber
k	Kilo (10^3)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
kJ	Kilojoule
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
LSLB	<i>Low salt LB</i>
log	Dekadischer Logarithmus
Lsg.	Lösung

Abkürzungsverzeichnis

m	Milli (10^{-3})
M	Molar (mol/l)
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mol	Mol
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
μ	Mikro (10^{-6})
μ F	Mikrofahrenheit
MV	Methylviologen
n	Nano (10^{-9})
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
Nr.	Nummer
Ω	Ohm
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung
P _x	Promotor der Gens X
p	Pico (10^{-12})
Pa	Pascal
p.A.	<i>pro analysis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	Anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PRTase	Phosphoribosyltransferase
PTS	Phosphotransferase-System
RBS	Ribosomen-Bindestelle
R-M-Systeme	Restriktions-Modifikations-Systeme
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	<i>single strand</i> DNA
S-Layer	<i>Surface-Layer</i>
SSC	<i>Saline Sodium-Citrate</i> (-Puffer)
T	Thymidin
T _x	Terminator des Gens X
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
u.a.	unter anderem
UMP	Uracil-Monophosphat
ÜN	Über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPRTase	Uracil-Phosphoribosyltransferase
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vgl.	Vergleich
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Clostridien sind Gram-positive, Endosporen-bildende Bakterien der Familie *Clostridiaceae*, die durch ihren obligat anaeroben Energiestoffwechsel und ihre fehlende dissimilatorische Sulfatreduktion gekennzeichnet sind. Mit der Etablierung der Sequenzanalyse basierend auf der ribosomalen RNA (rRNA) konnten die Mikroorganismen dieser heterogenen Gruppe nach phylogenetischen Aspekten klassifiziert werden, wodurch die Komplexität der Clostridien verdeutlicht wurde (Stackebrandt and Hippe, 2001). Die Sporulation verleiht den Mitgliedern dieser Gruppe eine Resistenz gegenüber verschiedensten Umwelteinflüssen (Strahlung, Hitze, Trockenheit, Sauerstoff) und folglich die Möglichkeit einer ubiquitären Lebensweise. Zu ihren natürlichen Habitaten zählen verschiedene Böden und Sedimente sowie der humane Verdauungstrakt und der Verdauungstrakt höherer Tiere. Clostridien verfügen über ein weites Substratspektrum und eine große Stoffwechselvielfalt. Aufgrund dieser Fähigkeit werden sie in Abhängigkeit der Nährstoffansprüche in saccharolytische und/oder proteolytische Clostridien sowie Spezialisten klassifiziert (Hippe, 1992). Die Sekretion von Proteasen ermöglicht den proteolytischen Clostridien die Verwertung der 20 proteinogenen Aminosäuren (Buckel, Martins *et al.* 2005). Zu den proteolytischen Clostridien gehören einige pathogene Vertreter, die hochwirksame Toxine produzieren. Der Verderb von Lebensmitteln (*Clostridium perfringens*) und die Erkrankungen an Tetanus (*Clostridium tetani*) und Gasbrand (*Clostridium septicum*) sind nur einige schwerwiegende Folgen. Demgegenüber sind die saccharolytischen Clostridien zu sehen. Sie fermentieren eine Vielzahl verschiedener Kohlenhydrate zu organischen Säuren, Lösungsmitteln, Kohlendioxid und Wasserstoff. Dieses Potenzial macht sich die Biotechnologie zur Produktion von Biotreibstoffen zu Nutze (Jones, 2001) (Zverlov, Berezina *et al.* 2006; Chiao and Sun 2007). Einer dieser biotechnologisch relevanten Organismen ist *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

1.1 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 und seine biotechnologische Relevanz

Erste Erkenntnisse über die Produktion der solventogenen Lösungsmittel Aceton und Butanol reichen bis in die Mitte des 19. bzw. bis Anfang des 20. Jahrhunderts zurück (Pasteur, 1861a; Pasteur, 1861b; Pasteur, 1862; Schardinger, 1904; Schardinger, 1905). Chaim Weizmann gelang es im Jahre 1915 einen Aceton- und Butanol-produzierenden Stamm (Stamm BY) zu isolieren (Gabriel, 1928), dessen Namensänderung nach einigen Jahren in *Clostridium acetobutylicum* folgte. Während des 1. Weltkrieges richtete sich das Interesse auf die Produktion von Aceton, welches für die Herstellung des Sprengstoffes Cordit benötigt wurde. Erst zwischen den Kriegen und mit Beginn der Fließbandproduktion stieg das Interesse der Butanol-Produktion. Ausgehend von Butanol wurde Butylacetat als Lösungsmittel für die Lackierung von Autos erzeugt. Die fermentative Herstellung der Lösungsmittel Aceton und Butanol für die Produktion von Cordit und Autolacken wurde während der 50er Jahre durch kostengünstigere Erdöl-basierende Prozesse verdrängt (Jones and Woods 1986). Mit der aufkommenden Öl-Krise im Jahre 1973 verdeutlichte sich die Limitierung des Erdöls und das Interesse an der biotechnologischen Produktion unter Verwendung von erneuerbaren Ressourcen resultierte in einem Aufschwung der Forschung (Dürre, 1998) (Mitchell 1998). Um die biotechnologische Produktion von Aceton und Butanol gegenüber den petrochemischen Verfahren konkurrenzfähiger zu gestalten, war die biochemische Charakterisierung der verantwortlichen Enzyme und die Identifizierung der an der Solventogenese beteiligten Gene und Operon-Strukturen erforderlich (Walter, Bennett *et al.* 1992; Dürre, Fischer *et al.* 1995). Für eine Verbesserung seitens der ABE- (Aceton, Butanol, Ethanol) Fermentation wurde nach Alternativen zur Destillation gesucht (Ezeji, Qureshi *et al.* 2004; Ezeji, Karcher *et al.* 2005) und die Entwicklung genetisch-veränderter Stämme mit erhöhter Produktausbeute und Lösungsmitteltoleranz vorangetrieben (Tomas, Welker *et al.* 2003; Borden and Papoutsakis 2007). Heute steht die biotechnologische Produktion von Biokraftstoffen in Zusammenhang mit der Verminderung der Treibhausgase (Dürre 2007; Dürre 2008). Neben der Verwendung von Butanol als Biotreibstoffe (Noack, 2009; Lee, 2008) können zwei weitere Produkte von *C. acetobutylicum* für industrielle Zwecke genutzt werden. Acetoin (Andersch, 1982; Bunday, 1989) und Buttersäure sind als

Geschmacks- und Aromastoffe in der Lebensmitteltechnologie von Bedeutung (Watson, 2002).

Bereits im Jahre 2001 wurde das komplette Genom von *C. acetobutylicum* ATCC 824 sequenziert (Nölling, Breton *et al.* 2001). Neben dem Chromosom mit einer Größe von 3,9 Mbp konnte in *C. acetobutylicum* das Megaplasmid pSOL1 (192 kbp) identifiziert werden. Dieses Plasmid ist Träger vieler an der Solventogenese beteiligter Gene (Cornillot, Nair *et al.* 1997), dessen Verlust die Lösungsmittelproduktion und die Fähigkeit zur Sporulation negativ beeinflusst (Alsaker and Papoutsakis 2005). Der Organismus verfügt über einen sehr niedrigen G + C Gehalt von 31 % und 4022 offene Leserahmen. *C. acetobutylicum* zeichnet sich besonders durch sein vielfältiges Substratspektrum und der daraus resultierenden Stoffwechselvielfalt aus. Dies schließt zum einen die Verwertungen verschiedener Kohlenhydrate (Glukose, Laktose, Maltose, Saccharose, Cellobiose) als auch die Hydrolyse von Gelatine ein. Die Genomsequenz von *C. acetobutylicum* erlaubte verschiedene Möglichkeiten der Erforschung dieses Organismus. Die Untersuchung des Transkriptoms in Abhängigkeit der Wachstumsphasen ermöglichte beispielsweise die Expression aller Gene während der Acido- und Solventogenese aufzuklären (Alsaker and Papoutsakis 2005; Grimmeler, Janssen *et al.* 2011). Folglich stellt *C. acetobutylicum* eines der best-untersuchtesten Clostridien dar (Dürre 2007; Gheshlaghi, Scharer *et al.* 2009). Der Energiestoffwechsel basiert auf einer Substratketten-Phosphorylierung durch die Fermentationen von Kohlenhydraten. Der biphasische Gärungsstoffwechsel unterteilt sich in die Acidogenese und die Solventogenese. Die Acidogenese ist durch eine hohe Wachstumsrate und die Produktion von Acetat, Butyrat, Kohlendioxid und Wasserstoff gekennzeichnet (Jones and Woods 1986). Die enorme Säureproduktion resultiert in einem Absinken des pH-Wertes und führt ausgelöst durch im Detail unbekannte Faktoren zu einem *shift* in die Solventogenese. Zu den Faktoren könnten beispielsweise der Überschuss an Glukose bei gleichzeitigem Mangel an Phosphat und Schwefel, das Butyrat- bzw. Butyryl-Phosphat im Medium und das ADP/ATP bzw. NAD⁺/NADH-Verhältnis in der Zelle zählen. Für die Initiation des *shifts* könnte nicht nur einer dieser Faktoren ausschlaggebend sein (Bahl, 1982; Bahl and Gottschalk, 1984; Gottschalk and Morris, 1981; Hüsemann and Papoutsakis, 1986; Jewell, 1986; Terraciano and Kashket, 1986) (Holt, Stephens *et al.* 1984; Grupe and Gottschalk 1992; Paredes, Alsaker *et al.* 2005; Zhao, Tomas *et al.* 2005), vielmehr scheint die Kombination dieser

Faktoren die Lösungsmittelproduktion zu stimulieren (Dürre, Fischer *et al.* 1995) (Ullmann, 1996). Da die akkumulierenden Säuren bei sinkendem pH-Wert durch ihre entkoppelnde Wirkung toxisch sind, werden die gebildeten Säuren in einer Transitionsphase reassimiliert und mit dem verbliebenen Substrat während der Solventogenese in die primären Lösungsmittel Aceton, Butanol sowie Ethanol und Acetoin fermentiert (Dürre, 2005) (Harris, Welker *et al.* 2002). Mit Stagnation des bakteriellen Wachstums und bedingt durch den toxischen Effekt der Butanol-Konzentration (Dürre, Bohringer *et al.* 2002) wird die Sporulation des Organismus eingeleitet. Durch die Lösungsmittel-Produktion gewinnt der Organismus Zeit, die Sporenbildung zu initiieren und somit das Überleben der Zelle zu sichern (Dürre, Bohringer *et al.* 2002).

In der Abbildung 1.1 ist der fermentative Metabolismus von *C. acetobutylicum* graphisch zusammengefasst. Der Zucker-Transport in die Zelle wird durch 13 putative Phosphotransferase-Systeme (PTS) gewährleistet (Tangney and Mitchell 2007). Die Konvertierung von Glukose zu Pyruvat erfolgt anschließend über den EMP-Weg und die Energiegewinnung basiert auf der Substratketten-Phosphorylierung (s. Abbildung 1.1).

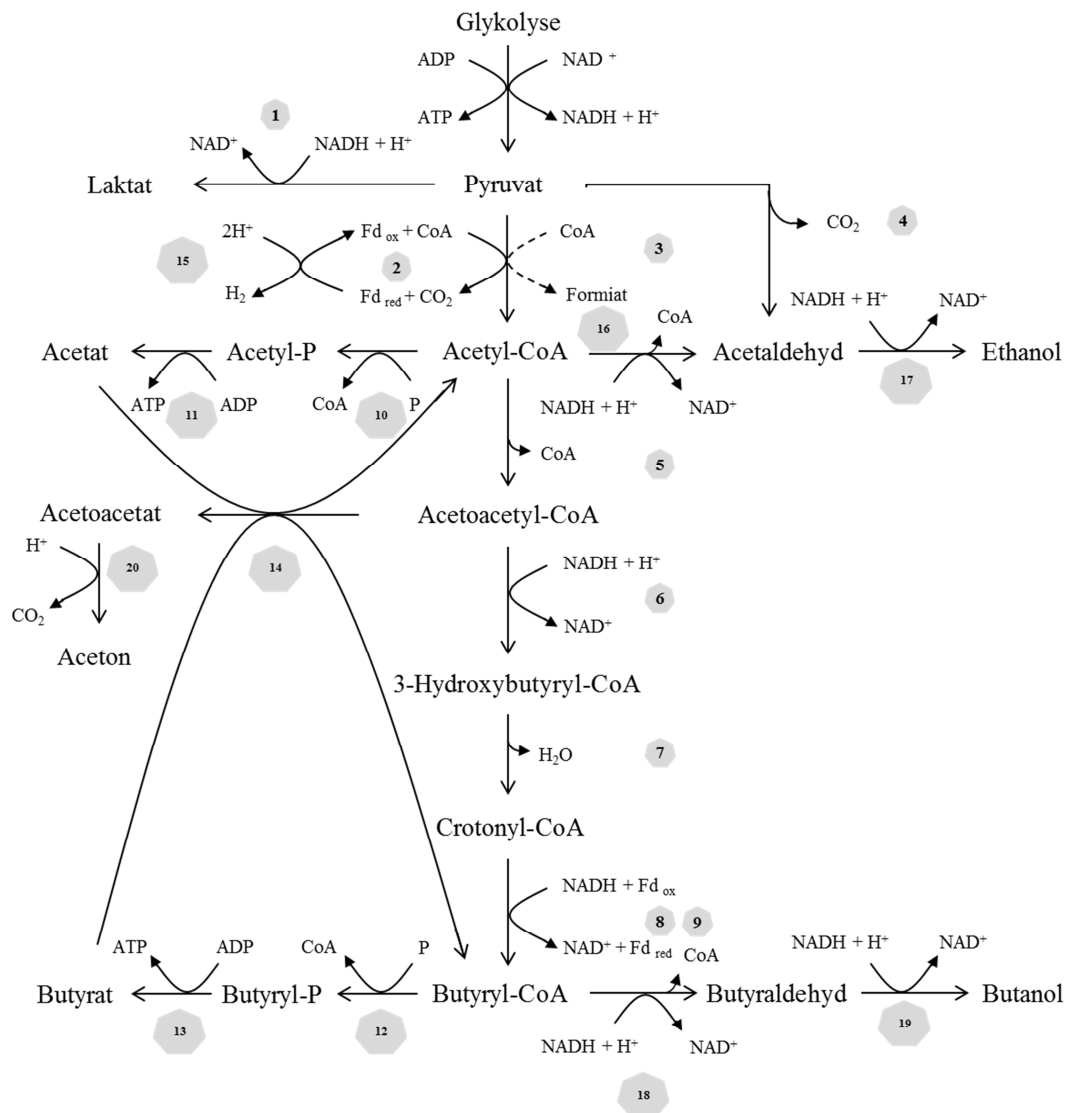


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des fermentativen Metabolismus von *C. acetobutylicum*. 1. L-Laktat-Dehydrogenase; 2. Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; 3. Pyruvat-Formiat-Lyase; 4. Pyruvat-Decarboxylase; 5. Thiolase; 6. 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; 7. Crotonase; 8. Butyryl-CoA-Dehydrogenase; 9. Elektronen-übertragende Flavoproteine (EtfA/EtfB); 10. Phosphotransacetylase; 11. Acetat-Kinase; 12. Phosphotransbutyrylase; 13. Butyrat-Kinase; 14. CoA-Transferase A/B; 15. Hydrogenase (HydA); 16. Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); 17. Acetaldehyd-Dehydrogenase, Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); 18. Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); 19. Butanol-Dehydrogenase (BdhA, BdhB); 20. Acetoacetat-Decarboxylase (Adc). Erläuterung im Text.

In *C. acetobutylicum* konnten drei Enzyme für die oxidative Verwertung von Pyruvat identifiziert werden. Die Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ durch die Sauerstoff-sensitive Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase stellt den Hauptabbau-Weg für Pyruvat dar (Meinecke, Bertram *et al.* 1989). Die während dieser Reaktion

entstanden Elektronen werden auf ein Ferredoxin übertragen, dessen niedriges Redoxpotential die Reduktion der Protonen für die Bildung von molekularem Wasserstoff durch die O₂-sensitive [FeFe]-Hydrogenase (HydA) ermöglicht (Jones and Woods 1986). Mit der Produktion von Wasserstoff wird folglich die Regeneration der reduzierten Elektronenträger in Form von reduziertem Ferredoxin gewährleistet und eine fortlaufende Acidogenese mit der Bildung von ATP ermöglicht. Ein zusätzliches Acetyl-CoA könnte durch die Umsetzung von Pyruvat zu Formiat mit Hilfe der Pyruvat-Formiat Lyase generiert werden. *C. acetobutylicum* ist der einzige solventogene Organismus unter den Clostridien, der über eine Pyruvat-Decarboxylase verfügt. Unter Abspaltung von CO₂ wird Pyruvat zu Acetaldehyd konvertiert und im weiteren Verlauf durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase und/oder die Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2) zu Ethanol reduziert. Pyruvat kann darüber hinaus infolge der Aktivität der L-Laktat-Dehydrogenase zu Laktat reduziert werden. Das Intermediärprodukt Acetyl-CoA stellt den Knotenpunkt des Metabolismus dar. In der Acidogenese wird Acetyl-CoA durch die Phosphotransacetylase und die Acetat-Kinase zu Acetat umgesetzt, wobei ATP generiert wird. Des Weiteren können zwei Moleküle Acetyl-CoA mit Hilfe der Thiolase zu Acetoacetyl-CoA umgesetzt werden. Infolge mehrerer Reaktionsschritte wird Acetoacetyl-CoA zunächst zu 3-Hydroxybutyryl-CoA und anschließend zu Crotonyl-CoA reduziert. Mit Hilfe des Butyryl-CoA-Dehydrogenase-EtfA/B-Komplex wird die NADH-abhängige Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA katalysiert und die Energie könnte für die NADH-abhängige Reduktion des Ferredoxins genutzt werden (Herrmann, Jayamani *et al.* 2008; Li, Hinderberger *et al.* 2008; Seedorf, Fricke *et al.* 2008; Köpke, Held *et al.* 2010). Unter Produktion von ATP wird Butyryl-CoA für die Synthese von Butyrat verwendet. Butyrat in hohen Konzentrationen scheint die Synthese der CoA-Transferase (CtfA/B) und dadurch die Reabsorption der produzierten Säuren zu induzieren (Dürre 2008). Die Metaboliten Acetyl- und Butyryl-CoA werden in der Solventogenese unter Verbrauch der Reduktionsäquivalente zu Ethanol und Butanol reduziert, sowie infolge einer Decarboxylierung des Acetoacetats zu Aceton umgesetzt. Die Synthese reduzierter Endprodukte dient zum einen dazu, überschüssige Reduktionsäquivalente (NADH + H⁺) zu entfernen und zum anderen Zeit für die Sporulation zu gewinnen. Eine steigende Butanol-Konzentration von über 2 % ist toxisch für den Organismus (Dürre, Bohringer *et al.* 2002). Die Fluidität der Cytoplama-Membran nimmt zu

(Ingram 1976; Vollherbst-Schneck, Sands *et al.* 1984; Baer, Blaschek *et al.* 1987; Baer, Bryant *et al.* 1989) und Transportproteine (Ounine, Petitdemange *et al.* 1985) (Bowles, 1985; Moreira, 1981) sowie ATPasen (Terraciano and Kashket, 1986) werden irreversibel geschädigt. Die Initiation der Sporulation ist eine Reaktion der Zelle auf veränderte Umwelteinflüsse und Wachstumsbedingungen zu reagieren und das Überleben zu sichern. Der Sporulationsregulator Spo0A wird infolge einer Phosphorylierung aktiviert und induziert eine kaskadenartige Phosphorylierung Sporulations-bezogener Sigma-Faktoren (Jones, Paredes *et al.* 2008). Der Zellzyklus endet mit der Keimung der Sporen zu vegetativen Zellen.

1.2 Hydrogenasen in *C. acetobutylicum*

Mit der Produktion von Aceton und Butanol und deren Nutzung als Biotreibstoffe stieg die biotechnologische Relevanz von *C. acetobutylicum*. Die Limitierung fossiler Brennstoffe weckte zudem das Interesse molekularen Wasserstoff als alternative Energiequelle zu verwenden (Benemann 1996) (Noike, Mizuno 2000). Sein hoher Energiegehalt ($122 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$) und seine saubere Verbrennung unterstreichen das enorme Potenzial, Wasserstoff für eine umweltfreundliche Energiewirtschaft zu nutzen (Mizuno, 2000) (Kyazze, Martinez-Perez *et al.* 2006). Im Hinblick auf die Reduzierung der Treibhausgase und einer positiven Energiebilanz stieg das Interesse, Wasserstoff aus erneuerbaren Ressourcen zu gewinnen. Darüber hinaus resultierte dieses Interesse in einem Aufschwung der Forschung zur biotechnologischen Produktion (Hussy, Hawkes *et al.* 2003) (van Ginkel, 2005). Für die industrielle Nutzung wurden fermentative Bakterien (Enterobakterien, Clostridien) hinsichtlich ihrer biotechnologischen Relevanz zur Wasserstoff-Produktion untersucht. Ihre hohe Produktionsrate an Wasserstoff, verglichen mit Grünalgen (Laurinavichene, Kosourov *et al.* 2008) und Cyanobakterien (Lindblad, 2002), und ihre Fähigkeit als Destruenten organischen Substanzen abzubauen und parallel einen nützlichen Energieträger zu generieren (Lay, 1999; Nielsen, 2001) (Lee, Wu *et al.* 2004), untermauern ihre biotechnologische Bedeutung. Hydrogenasen katalysieren die reversible Reduktion von Protonen zu molekularem Wasserstoff. Infolge dieser Reduktion können überschüssige Reduktionsäquivalente oxidiert und deren biochemische Überträgermoleküle regeneriert werden, wodurch eine Homöostasis aufrechterhalten wird (Gray and Gest 1965). Die Wasserstoff-Oxidation ermöglicht

hingegen dem Organismus molekularen Wasserstoff als Energiequelle zu verwenden (Bowien and Schlegel 1981). Hydrogenasen werden entsprechend der elementaren Bestandteile ihres katalytischen Zentrums in Gruppen klassifiziert. Die [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen sind durch einen [Ni-Fe]-Komplex oder durch einen dinuklearen Eisenkomplex im aktiven Zentrum gekennzeichnet (Vignais, Billoud *et al.* 2001). Während ihre aktiven Zentren durch ihre dimetallische Struktur und die Koordination der Eisenatome mit den CO- und CN-Liganden vergleichbar sind (Nicolet, Lemon *et al.* 2000), unterscheiden sich beide Hydrogenase-Klassen hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität deutlich voneinander. Die [FeFe]-Hydrogenasen zeigen verglichen mit den [NiFe]-Hydrogenasen eine deutlich höhere Aktivität in der Wasserstoff-Produktion wie auch in dem Wasserstoff-Verbrauch (Frey 2002). Ein weiterer Unterschied beider Enzymklassen wird durch die Empfindlichkeit gegenüber Luftsauerstoff verdeutlicht. Während [NiFe]-Hydrogenasen zum Teil Sauerstoff tolerant sind oder lediglich reversibel inhibiert werden (Schneider, Cammack *et al.* 1979), tritt infolge eines Sauerstoff-Kontakts eine irreversible Schädigung der [FeFe]-Hydrogenasen auf (Erbes, King *et al.* 1979). Die Inaktivierung des Enzyms ist durch die Oxidation der Eisen-Schwefel-Zentren begründet (Imlay 2006). Für den Mechanismus des Elektronen-, Protonen und Wasserstoff-Transports vom aktiven Zentrum zu den Elektronen-Akzeptoren oder der Proteinoberfläche konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Hydrogenase-Klassen festgestellt werden (Montet, Amara *et al.* 1997; Peters, Lanzilotta *et al.* 1998; Nicolet, Piras *et al.* 1999).

Unter dem Gesichtspunkt, dass im Zuge dieser Arbeit ausschließlich eine [FeFe]-Hydrogenase näher untersucht wurde, beschränken sich die weiteren Erläuterungen auf diese Enzymklasse. Die Charakterisierung der Proteinstruktur und des katalytischen Zentrums beruhen auf vorhergehenden Untersuchungen der [FeFe]-Hydrogenasen von *C. pasteurianum* (CpI) und *Desulfovibrio desulfuricans* (DdH) (Peters, Lanzilotta *et al.* 1998; Nicolet, Piras *et al.* 1999). [FeFe]-Hydrogenasen sind zumeist als Monomere beschrieben, wobei auch multiple Proteinstrukturen in Erscheinung treten: *Desulfovibrio* (Voordouw and Brenner 1985; Nicolet, Piras *et al.* 1999) und *Trichomonas vaginalis* (Payne, Chapman *et al.* 1993). Mit Hilfe von Sequenzvergleichen konnten zwei funktionelle Domänen der [FeFe]-Hydrogenasen identifiziert werden (Adams 1990). Die C-terminale H-Domäne ist Sitz des katalytischen Zentrums (H-Kluster) und trägt zudem eine Vielzahl konservierter

Aminosäuren (Vignais, Billoud *et al.* 2001). Im Kontrast dazu ist die N-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne (F-Domäne) zu sehen. Sie enthält mehrere [4Fe4S]- oder [2Fe2S] Kluster, die den Elektronentransport zwischen den externen Elektronen-Donoren bzw. -Akzeptoren und dem katalytischen Zentrum vermittelt (Peters, Lanzilotta *et al.* 1998; Nicolet, Piras *et al.* 1999). Die [2Fe2S]- [4Fe4S]-Kluster sind über ein Cystein miteinander verbunden und so in das Protein integriert (Peters 1999). Im katalytischen Zentrum der [FeFe]-Hydrogenasen sind beide Eisen-Atome des H-Kluster mit jeweils einem CO- und CN-Liganden assoziiert. Während des oxidativen Zustandes sind sie indes durch ein überbrückendes CO-Molekül miteinander verknüpft. Des Weiteren werden die beiden Eisen-Atome durch einen organischen Liganden koordiniert (Dithiopropan oder Dithiomethylamin) (Nicolet, de Lacey *et al.* 2001). Vorhergehende Studien postulierten, dass die Aktivität der Hydrogenasen in Abhängigkeit zur Expression von Hydrogenase-Maturationsproteinen steht. Maturationsproteine sind für die Biosynthese einzelner katalytischer Metallokluster verantwortlich und werden zusammen mit der Hydrogenase co-exprimiert (Lutz, Jacobi *et al.* 1991; Drapal and Böck 1998; Blokesch, Paschos *et al.* 2002; Blokesch, Albracht *et al.* 2004; Posewitz, King *et al.* 2004). In *C. acetobutylicum* konnten drei Gene von Maturationsproteinen (*hypE*, *hypF*, *hybG*) einer [FeFe]-Hydrogenase identifiziert werden (King, Posewitz *et al.* 2006). Die Ferredoxin-abhängige [FeFe]-Hydrogenase HydA ist für die Produktion von 2,0 mol H₂/mol Glukose verantwortlich (Warner and Lolkema 2003) und verfügt zusätzlich zu anderen Hydrogenasen über drei [4Fe4S] und ein [2Fe2S] Eisen-Schwefel-Kluster (Peters, Lanzilotta *et al.* 1998). Diese Eisen-Schwefel-Kluster sind in den Elektronen-Transfer zwischen dem aktiven Zentrum und dem Ferredoxin eingebunden und bedingen die Reduktion der Protonen (Peters, Lanzilotta *et al.* 1998). Die [FeFe]-Hydrogenase HydA ist zudem am Aufbau der Protonenmotorischen-Kraft und der Alkalisierung des Zellinneren beteiligt. Im Zuge der Lösungsmittel-Produktion ist die Aktivität der 64,5 kD großen Hydrogenase jedoch deutlich herabreguliert (Gorwa, Croux *et al.* 1996). Neben HydA (CA_C0028) konnte in *C. acetobutylicum* eine weitere [FeFe]-Hydrogenase (HydB CA_C3230) identifiziert werden. Untersuchungen zeigten jedoch, dass HydB eine fünf-fach niedrigere Aktivität im Vergleich zu HydA aufweist. Folglich ist HydA primär für die H₂-Produktion in *C. acetobutylicum* verantwortlich (King, Posewitz *et al.* 2006). Neben den [FeFe]-Hydrogenasen (CA_C0028, CA_C3230) konnte eine [NiFe]-

Hydrogenase mit ihren Maturationsproteinen (CA_P0141-CA_P0143) nachgewiesen werden (Nölling, Breton *et al.* 2001). Sie sind auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisiert und vermutlich für den H₂-Verbrauch der Zelle verantwortlich.

Die Lösungsmittelproduktion in *C. acetobutylicum* könnte in Abhängigkeit zum NADH-Gehalt der Zelle stehen. Mit der Regeneration der reduzierten Elektronenträger wird die Produktion von Wasserstoff und den reduzierten Lösungsmitteln Ethanol und Butanol angetrieben. Vorhergehende Studien postulierten in *C. acetobutylicum* eine NADH-Ferredoxin-Oxidoreduktase Aktivität (Blusson, Petitdemange *et al.* 1981; Vasconcelos, Girbal *et al.* 1994). Das Enzym, dessen Gen bislang noch nicht identifiziert werden konnte, könnte die thermodynamisch ungünstige Reduktion des Ferredoxins durch das Reduktionsäquivalent NADH katalysieren. Darüber hinaus kann in einer reversiblen Reaktion der NADH-Gehalt infolge der Reduktion von NAD⁺ durch reduziertes Ferredoxin gesteigert und dadurch die Lösungsmittelproduktion beeinflusst werden. In diesem Fall spricht man von einer Ferredoxin-NAD⁺-Reduktase Aktivität (Jungermann, Thauer *et al.* 1973; Petitdemange, Cherrier *et al.* 1977; Gonzalez-Pajuelo, Meynial-Salles *et al.* 2006). Der NADH-Gehalt und daraus resultierend die Lösungsmittelproduktion könnten zudem durch die H₂-oxidierenden Hydrogenasen beeinflusst werden. So zeigte Nakayama *et al.* mit der Repression einer H₂-oxidierenden Hydrogenase (HupCBA), dass der H₂ und Aceton Gehalt in der Zelle stieg, wenngleich die Butanol-Konzentration, bedingt durch den verminderten NADH-Gehalt, abnahm (Nakayama, Kosaka *et al.* 2008). Mit der Produktion von Wasserstoff nimmt die Ferredoxin-abhängige [FeFe]-Hydrogenase HydA (CA_C0028) eine zentrale Rolle in der Regeneration der Reduktionsäquivalente in Form von reduziertem Ferredoxin und folglich in der Regulation des Elektronenflusses ein. Die Wasserstoff-Produktion steht dabei in Korrelation zur Butanol-Synthese (Kim, Bellows *et al.* 1984). Für die Optimierung der Lösungsmittelproduktion könnte daher die Inaktivierung der *in vivo* Hydrogenase Aktivität eine geeignete Methode sein. Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass unter Eisen-limitierenden Bedingungen die Aktivität der Eisen-Schwefel abhängigen Hydrogenase sank und daraus resultierend das Butanol-Aceton Verhältnis 11:1 stieg (Junelles, 1988, Klein, 2009). Darüber hinaus konnte die Hydrogenase Aktivität infolge einer Kohlenmonoxid Begasung reversibel inhibiert und als Folge dessen, der

Butanol Gehalt gesteigert werden (Kim, Bellows *et al.* 1984; Datta and Zeikus 1985). Jedoch handelt es sich bei diesen Formen der Enzym-Inaktivierungen um unspezifische Schädigungen, die weniger zielgerichtet ein Enzym betreffen, sondern vielmehr eine Reihe von Enzymen in ihrer Aktivität inhibieren. Um den direkten Einfluss der H₂-produzierenden [FeFe]-Hydrogenase HydA auf die Lösungsmittelproduktion zu untersuchen, ist die Inaktivierung des Enzyms auf genetischer Ebene erforderlich. Bisherige Versuche, die Ferredoxin-abhängige [FeFe]-Hydrogenase HydA (CA_C0028) zu deletieren, waren nicht erfolgreich.

1.3 Inaktivierung und Modifikation der Enzym-Aktivität

Erste Versuche der Übertragung von Fremd-DNA basierten auf der Protoplasten-Transformation und dem konjugativen Transfer (Lin and Blaschek 1984; Williams, Young *et al.* 1990). Die geringe Transformationseffizienz lieferte jedoch die Notwendigkeiten nach alternativen Methoden zu suchen. *C. acetobutylicum* ist durch eine hohe Anzahl Zellwand-assoziiierter DNAsen (Lin and Blaschek 1984) und die Anwesenheit artspezifischer Restriktions-Modifikations-(R-M) Systeme gekennzeichnet. Die geringe Transformationseffizienz könnte folglich auf die Restriktion transformierter DNA durch die Aktivität cytoplasmatischer Restriktionsendonukleasen zurückzuführen sein (Mermelstein, Welker *et al.* 1992; Purdy, O'Keeffe *et al.* 2002). Mit der Identifizierung der Typ II Restriktionsendonuklease Cac824I konnte das Restriktions-Modifikations-(R-M) System in *C. acetobutylicum* charakterisiert und eine Grundlage für die Entwicklung effizienter Elektroporationen geschaffen werden (Mermelstein, Welker *et al.* 1992). Die Restriktionsendonuklease erkennt und schneidet spezifische Sequenzmotive (5'-GCNGC-3' bzw. 5'-GGCC-3') und verhindert infolgedessen die Replikation circulärer genetischer Elemente (Mermelstein, Welker *et al.* 1992). Mit der Etablierung des *in vivo* Methylierungs-Verfahren durch die Methyltransferase Φ 3TI des *B. subtilis* Phagen Φ 3T (Noyer-Weidner, Jentsch *et al.* 1985) wird der interne Cytosinrest der Sequenzmotive 5'-GCNGC-3' bzw. 5'-GGCC-3' methyliert und demzufolge eine Restriktion der Fremd-DNA verhindert (Mermelstein and Papoutsakis 1993). Voraussetzung für die *in vivo* Methylierung ist die Verwendung eines *E. coli* Stammes (*E. coli* ER2275), dessen kodierendes Gen für die Methylcytosin-spezifische Endonuklease Mcr deletiert ist und die Anwesenheit des

Vektors pAN1 mit dem kodierenden Gen der Methyltransferase Φ 3TI. Mit der Identifizierung der Typ II Restriktionsendonuklease Cac824I und der Etablierung der *in vivo* Methylierung wurde die Grundlage für die molekularbiologische Forschung in *C. acetobutylicum* geschaffen. Diese Methode ermöglicht die Generierung genetisch-veränderter Stämme, die Charakterisierung einzelner Enzyme und daraus resultierend die Verzweigung von Stoffwechselwegen.

Mit der Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* rückte der industriell relevante Organismus mehr und mehr in den Fokus des Interesses (Nölling, Breton *et al.* 2001). Für die Untersuchung der Funktion einzelner Genprodukte finden die gerichtete und ungerichtete Mutagenese sowie die Reduzierung der Genexpression durch die Antisense-RNA Technologie Anwendung. Während sich die Forschung anfangs auf die Überexpression homologer Gene für die Optimierung der Lösemittelproduktion konzentrierte (Mermelstein, Welker *et al.* 1992; Nair and Papoutsakis 1994; Walter, Mermelstein *et al.* 1994; Boynton, Bennet *et al.* 1996; Boynton, Bennett *et al.* 1996), rückte die Reduzierung der Enzym-Produktion auf genetischer Ebene als essentielle Methode des *metabolic engineering* in den Hintergrund. In vereinzelt Studien konnte jedoch eine Geninaktivierung infolge der Integration eines nicht-replikativen Vektors erfolgreich angewandt werden (Green and Bennett 1996; Green, Boynton *et al.* 1996). Die Nachteile dieses Verfahrens sind der Verbleib eines Selektionsmarkers im Genom, die daraus resultierende Interferenz des Antibiotikums mit nachfolgenden genetischen Analysen und die beschränkte Verfügbarkeit von Antibiotika-Resistenzgenen. Folglich sind Mehrfach-Deletionen im Genom von der Anzahl verfügbarer Selektionsmarker abhängig. Unter diesen Gesichtspunkten rückten alternative Methoden zur Inaktivierung von Genen in den Vordergrund.

Die Antisense-RNA Technologie stellt eine alternative, flexible und effiziente Methode für die Reduzierung der Genexpression und dadurch der Enzym-Produktion dar. Die Verminderung der Genexpression auf Basis der Antisense-RNA Technologie konnte in vorhergehenden Studien erfolgreich eingesetzt werden (Coleman, Green *et al.* 1984; Pestka, Daugherty *et al.* 1984; Kernodle, Voladri *et al.* 1997). Desai *et al.* demonstrierten als Erste die Effektivität der Antisense-RNA Technologie in *C. acetobutylicum* (Desai and Papoutsakis 1999). Die Wirkungsweise der Technologie zur Reduzierung der Enzym-Produktion ist dabei vielfältig. Die

Transkription der Antisense-RNA zieht, aufgrund der Komplementarität, eine Bindung derselbigen an die mRNA nach sich. Als Folge dessen wird die RNA-Translation durch die erschwerte Interaktion des Ribosomen mit der Ribosomen-Bindestelle (RBS) verhindert. Des Weiteren kann infolge der RNA-RNA-Hybridisierung eine veränderte Struktur der mRNA hervorgerufen werden, so dass RNasen diese schneller degradieren und daraus resultierend die Translation unterbinden (Wagner and Simons 1994). Im Hinblick auf Deletionen in polycistronischen Transkriptionseinheiten oder die insertionelle Inaktivierung von Genen, in deren Folge starke polare Effekte auf benachbarte Gene hervorgerufen werden, ist die Antisense-RNA Technologie eine effektive Methode, die Genexpression gezielt zu reduzieren, ohne dabei starke polare Effekte auf andere Gene auszulösen (Perret, Maamar *et al.* 2004). Darüber hinaus können Gene, deren Deletionen sich letal auf den Organismus ausüben, hinsichtlich ihrer Rolle im Zentralstoffwechsel untersucht werden.

Für die Mutationen einzelner Gene werden gerichtete oder ungerichtete Mutagenese-Systeme verwendet (Harwood and Cutting, 1990). Als Beispiel der ungerichteten Mutagenese sei die Transposonmutagenese genannt. Diese effiziente Methode wird erfolgreich für die genetische Analyse von Mikroorganismen eingesetzt. Die Transposons inserieren zumeist zufällig (Tn10, TnYLB-1) oder mit einer starken Sequenz-Präferenz (Tn919) in das Genom der Mikroorganismen. Die enorme Variabilität der Insertion und die Fähigkeit ohne bestimmte Faktoren des Bakteriums die Transposition durchzuführen, unterstreichen das Potential des *mariner* Transposons (TnYLB-1) für die Erzeugung zufälliger Mutationen in einer Vielzahl von Bakterien (Rubin, Akerley *et al.* 1999; Pelicic, Morelle *et al.* 2000; Wong and Mekalanos 2000; Guo and Mekalanos 2001; Sasseti, Boyd *et al.* 2001; Lamichhane, Zignol *et al.* 2003; Youderian, Burke *et al.* 2003; Bourhy, Louvel *et al.* 2005; Le Breton, Mohapatra *et al.* 2006; Cartman and Minton 2010). An beiden Enden von *inverted repeats* umgeben, inseriert das *mariner* Transposon mit Hilfe des *cut and paste* Mechanismus in die „TA“-Dinukleotid-Zielsequenzen (Lampe, Churchill *et al.* 1996; Lampe, Grant *et al.* 1998). Diese Art der Insertion stellt besonders für Bakterien mit einem niedrigen G + C Gehalt einen enormen Vorteil dar. Die entstanden Zufallsmutanten mit resultierendem Phänotyp können anschließend untersucht werden.

Für eine einfache und hocheffiziente Geninaktivierung wird die gerichtete Mutagenese unter Verwendung positiver Selektionsmarker eingesetzt. Mit der insertionellen Mutagenese via ClosTron (Heap, Pennington *et al.* 2007) und der Insertion von Antibiotika-Resistenzgenen über flankierend homologe Bereiche seien zwei verschiedene Methoden zur zielgerichteten Geninaktivierung genannt. Jedoch ist deren Verwendung mit einigen im oberen Abschnitt aufgeführten Nachteilen verbunden. Unter diesen Gesichtspunkten werden Antibiotika-Resistenzgene unter Verwendung von Gegenselektionsmarkern aus dem Chromosomen entfernt (Reyrat, Pelicic *et al.* 1998). Der Vorteil dieser markerfreien Deletionssysteme liegt in der Erzeugung multipler Mutationen ohne die Insertion von Antibiotikaresistenzgenen. Für die genetische Manipulation von Prokaryonten steht eine Vielzahl von Gegenselektionsmarkern zur Verfügung. Einer dieser Gegenselektionsmarker für die Etablierung von markerfreien Deletionen beruht auf den kodierenden Genen der Phosphoribosyltransferasen (PRTasen) (Spring, Mattick *et al.* 1994; Fukagawa, Hayward *et al.* 1999; Peck, DasSarma *et al.* 2000; Fabret, Ehrlich *et al.* 2002; Bitan-Banin, Ortenberg *et al.* 2003; Pritchett, Zhang *et al.* 2004; Kristich, Manias *et al.* 2005). Mit Hilfe der PRTasen werden freie Purine oder Pyrimidine in ihre korrespondierenden Nukleotid-Monophosphate regeneriert. Darüber hinaus können PRTasen Basenanaloga umsetzen, in deren Folge toxische Nukleotidanaloga entstehen. Mutationen in den Genen von PRTasen unterbinden diesen Effekt und schaffen die Grundlage einer Gegenselektions-Strategie. Das *upp*-Deletionssystem sei als Beispiel einer auf PRTasen basierenden Gegenselektions-Strategie genannt (s. Abbildung 1.2 A+B).

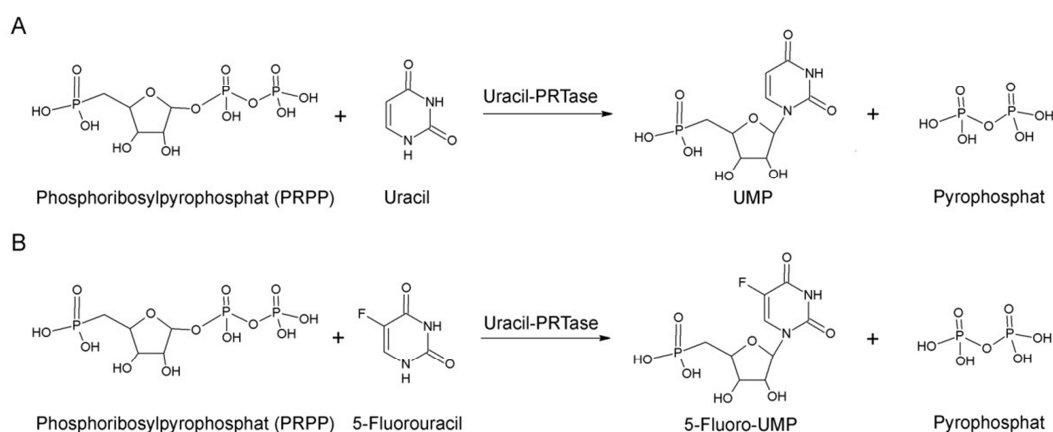


Abbildung 1.2: Katalytische Wirkung der Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase).
A: Umwandlung des Uracils in sein korrespondierendes Monophosphat (UMP). **B:** Umwandlung des toxischen Pyrimidinanalogen 5-Fluorouracil in sein korrespondierendes Monophosphat (5-Fluoro-UMP). Nach Arne Fabritius, Masterarbeit (2010).

Die Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) katalysiert die Umwandlung des Uracils in sein korrespondierendes Monophosphat (UMP), wodurch der Zelle die Verwendung von exogenem Uracil ermöglicht wird (Neuhard, 1983; Nygaard, 1993). Darüber hinaus kann die UPRTase das Pyrimidinanalogen 5-Fluorouracil (5-FU) umsetzen und es in sein korrespondierendes Monophosphat 5-Fluoro-UMP umwandeln. Infolge der Biosynthesen von Desoxyribonukleotiden wird aus 5-Fluoro-UMP 5-Fluoro-dUMP, ein wirksamer Inhibitor der Thymidylat Synthase (Neuhard, 1983). Dieses inhibiert die DNA-Replikation, wodurch die Zelle stirbt. Für die Verwendung von 5-Fluorouracil (5-FU) als Gegenselektionsmarker ist jedoch zunächst eine Inaktivierung des *upp* Gens erforderlich. Die Gegenselektions-Strategie, basierend auf dem toxischen Effekt des 5-FU, wurde erfolgreich für die Etablierung markerfreier Deletionssysteme in *B. subtilis* und *Enterococcus faecalis* eingesetzt (Fabret, Ehrlich *et al.* 2002; Kristich, Manias *et al.* 2005).

Eine weitere Form der gerichteten Mutagenese zur Erzeugung markerfreier Deletionen basiert auf der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} (Arnaud, Chastanet *et al.* 2004). Die Temperatursensitivität des Replikationsursprunges geht dabei auf eine mutierte Form des Vektors pE194 zurück (Villafane, Bechhofer *et al.* 1987). Als Folge dessen wird eine stabile Replikation des Vektors nur bei Temperaturen unterhalb von 37°C gewährleistet. Temperaturen von 37°C und 42°C unterbinden unterdessen eine stabile Replikation des Vektors. Mit

Hilfe dieses Deletionssystems wird die Erzeugung multipler Mutationen ohne die vorherige Modifikation des Ausgangsstammes gewährleistet.

1.4 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Antisense-RNA Technologie Auswirkungen einer Reduktion der Hydrogenase HydA Menge auf Translationsebene auf die Solventogenese in *C. acetobutylicum* ATCC 824 zu untersuchen. Dabei galt es, die Auswirkung einer reduzierten Genexpression der Hydrogenase HydA anhand von quantitativen Analysen der Hydrogenase-Aktivität, der H₂-Produktion und des Fermentationsverhaltens zu ermitteln. Die aus physiologischer Sicht gewonnenen Erkenntnisse sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf transkriptioneller Ebene durch DNA-Microarrays verifiziert werden.

Des Weiteren galt es, erste Erkenntnisse in Bezug auf die Etablierung markerfreier Deletionssysteme in Form des *upp*-Deletionssystems und der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} in *C. acetobutylicum* zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Im Zuge dieser Arbeit wurden folgende Stämme und Plasmide verwendet. Sie sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 aufgelistet. Eine übersichtliche Darstellung der verwendeten Oligonukleotide, Enzyme, Chemikalien und Geräte ist den Tabellen im Anhang zu entnehmen (s. Tabelle 7.1-7.5).

Tab. 2.1: Verwendete Organismen

Stamm	Geno- / Phänotyp	Herkunft / Referenz
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Wildtyp	(Nölling, Breton <i>et al.</i> 2001)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> pDK1	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 mit dem Plasmid pDK1	Diese Arbeit
<i>Clostridium acetobutylicum</i> pDK2	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 mit dem Plasmid pDK2	Diese Arbeit
<i>Clostridium acetobutylicum</i> pDK3	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 mit dem Plasmid pDK3	Diese Arbeit
<i>Clostridium acetobutylicum</i> pSOSzero	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 mit dem Plasmid pSOSzero	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3	$\Delta hsdR1, \Delta hsdR2$	(Waschkau, Waldeck <i>et al.</i> 2008)

Material und Methoden

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>supE44</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , λ^-	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	(Priefer, Simon <i>et al.</i> 1985)
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), 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
<i>E. 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> , e14 ⁻ Δ (<i>lac</i>)U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , R(<i>zbgZ10::Tn10</i>)Tc ^s , Δ (<i>mcr-hsd-mrr</i>)114::1510, [F', <i>proAB</i> , <i>laqI</i> ^q Δ M15 <i>zzd::mini Tn10</i> (Km ^r)]	Prof. Dr. E. T. Papoutsakis; Evanston, USA
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>recA13 leuB6</i> <i>ara-14 proA2 lacY1 galK2</i> <i>xyl-5 mtl-1 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>glnV44</i> λ^-	(Boyer and Roulland-Dussoix 1969)

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	Eigenschaft	Herkunft / Referenz
pAN1	7,0	Cm ^R , ϕ 3tI, p15A oriR	(Mermelstein and Papoutsakis 1993)
pCH1	4,328	Amp ^R , Ery ^R	Claudia Held
pCR4 Topo	3,957	Amp ^R , Ery ^R	Invitrogen
pDK1	6,636	Amp ^R , Ery ^R , 94 % des <i>hydA</i> -Gens in Antisense-Orientierung	Diese Arbeit
pDK2	6,036	Amp ^R , Ery ^R , 60 % des <i>hydA</i> -Gens in Antisense-Orientierung	Diese Arbeit
pDK3	5,516	Amp ^R , Ery ^R , 30 % des <i>hydA</i> -Gens in Antisense-Orientierung	Diese Arbeit
pDK4	6,146	Amp ^R , Ery ^R , <i>adc</i> , <i>evoglow-Pp1-Cl</i>	Diese Arbeit
pDK5	6,108	Amp ^R , Ery ^R , <i>adc</i> , <i>evoglow-Bs2-Cl</i>	Diese Arbeit
pDK6	7,814	Amp ^R , Ery ^R , Promotor des <i>adc</i> -Gens, <i>evoglow-Pp1-Cl</i>	Diese Arbeit
pDK8	9,476	Amp ^R , Ery ^R , <i>pre</i> , ohne oriR pE194 ^{ts}	Diese Arbeit

Material und Methoden

pDK9	11,445	Amp ^R , Ery ^R , <i>pre</i> , ohne oriR pE194 ^{ts} , <i>mariner HimarI</i> Transposase (σ^A -Promotor), TnYLB-1	Diese Arbeit
pDK11	7,967	pMADK-Derivat mit dem Uracil- Phosphoribosyltransferase- Gen (<i>upp</i>)	Diese Arbeit, Arne Fabritius
pDK12a	9,512	pDK11 mit Fusion zur Deletion der Endonuklease Cac824I	Diese Arbeit, Arne Fabritius
pDK12b	9,512	pDK11 mit Fusion zur Deletion der Endonuklease Cac824I in umgekehrter Orientierung	Diese Arbeit, Arne Fabritius
pDK13	9,467	pDK11 mit Fusion zur Deletion des Pyruvat- Decarboxylase-Gens (<i>pdc</i>)	Diese Arbeit
pDK14	9,568	pDK11 mit Fusion zur Deletion des Pyruvat- Formiat-Lyase-Gens (<i>pflB</i>)	Diese Arbeit
pDK15	8,246	pJIR750-Derivat mit Fusion zur Deletion des Uracil-Phosphoribosyl- transferase-Gens (<i>upp</i>)	Diese Arbeit

Material und Methoden

pDK16	5,885	pCH1-Derivat mit Fusion zur Deletion des Uracil-Phosphoribosyltransferase-Gens (<i>upp</i>)	Diese Arbeit
pDK17	7,086	pDK16 mit Rekombinase A CA_C1815	Diese Arbeit
pGlow-Bs2-Cl	3,094	Amp ^R , Fluoreszenz-Reporterprotein aus <i>Bacillus subtilis</i>	Evocatal GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
pGlow-Pp1-Cl	3,127	Amp ^R , Fluoreszenz-Reporterprotein aus <i>Pseudomonas putida</i>	Evocatal GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
pJIR750	6,568	Cm ^R , <i>lacZ</i> Reporter-Gen, Shuttle-Vektor	(Bannam and Rood 1993)
pKVM1	10,351	Amp ^R , Ery ^R , <i>pre</i>	Michael Rachinger, 2010
pMAD	9,666	Amp ^R , Ery ^R	(Arnaud, Chastanet <i>et al.</i> 2004)
pMADK	7,193	Amp ^R , Ery ^R , pMAD ohne die β -Galaktosidase	Diese Arbeit
pMADK ^{upp}	8,868	pMADK-Derivat mit Fusion zur Deletion des Uracil-Phosphoribosyltransferase-Gens (<i>upp</i>)	Diese Arbeit

Material und Methoden

pMADK _{upp} ^{-II}	8,872	pMADK-Derivat mit Fusion zur Deletion des Uracil-Phosphoribosyltransferase-Gens (<i>upp</i>) in umgekehrter Orientierung	Diese Arbeit
pMADK _{upp} ⁻ oriR pE194 ^{ts}	7,993	pMADK-Derivat mit Fusion zur Deletion des Uracil-Phosphoribosyltransferase-Gens (<i>upp</i>), ohne oriR pE194 ^{ts}	Diese Arbeit
pMarA	8,253	Amp ^R , Ery ^R , Kan ^R , <i>mariner HimarI</i> Transposase mit σ^A -Promotor, TnYLB-1	(Le Breton, Mohapatra <i>et al.</i> 2006)
pMarC	6,875	Amp ^R , Ery ^R , Kan ^R , TnYLB-1	(Le Breton, Mohapatra <i>et al.</i> 2006)
pMarCKan ^{R-}	6,137	pMarC-Derivat ohne Kanamycin-Resistenzgen	Diese Arbeit
pRK2013	48	ColE1 Replicon, Kan ^R , Tn 903	(Figurski and Helinski 1979)
pSOS95	6,995	Amp ^R , Ery ^R , <i>sol</i> -Operon	(Desai and Papoutsakis 1999)
pSOSzero	4,696	Amp ^R , Ery ^R , ohne das <i>sol</i> -Operon	Diese Arbeit

2.2 Nährmedien und ihre fakultativen Zusätze

Puffer, Lösungen und Medien wurden mit deion. Wasser angesetzt und 20 min im Autoklav bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Thermolabile Substanzen und Kohlenstoffquellen wurden gelöst und anschließend sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm, Sartorius, Göttingen). Alle Angaben beziehen sich auf Wasser, außer wenn andere Lösungsmittel angegeben sind. Den Grundmedien wurden zur Verfestigung bei Herstellung von Plattenmedien 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

2.2.1 Komplexmedien

Die folgenden Medien wurden zur Anzucht und Kultivierung entsprechender Bakterien verwendet. Eine Zugabe von Antibiotika erfolgte bei der Verwendung verschiedener Plasmide.

LB (Luria-Bertani)-Medium (Sambrook *et al.*, 2001)

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

LSLB-Medium

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

RCA-Reinforced Clostridial Agar

RCA	51	g
H ₂ O	ad 1000	ml

2x YTG-Medium (Oultram *et al.*, 1988; mod.)

Glukose x H ₂ O	5	g
Trypton	16	g
Hefeextrakt	10	g
NaCl	5	g
H ₂ O	ad 1000	ml

2.2.2 Definierte Medien

Für den DNA-Transfer via Elektroporation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, sowie für die Transkriptionsanalysen und die Analyse der Kulturüberstände war es von Vorteil ein definiertes Medium zu verwenden.

CG-Medium

KH ₂ PO ₄	0,75	g
K ₂ HPO ₄	0,75	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,71	g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,010	g
NaCl	1	g
Hefeextrakt	5	g
H ₂ O	ad 800	ml

Nachdem der pH-Wert auf 6,9 eingestellt wurde, erfolgte das Autoklavieren des Mediums in einer Anaerobenflasche. Nach luftdichtem Verschließen der Anaerobenflasche und anschließendem Begasen unter Verwendung von Stickstoff, konnten folgende thermoinstabile Substanzen dem Medium zugesetzt werden.

Glukose	50	g
H ₂ O	ad 100	ml
Asparagin	2	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,010	g
H ₂ O	ad 100	ml

2.2.3 Medienzusätze

Die in Tabelle 2.3 aufgeführten Medienzusätze wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Nach Abkühlung der Medien auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe in entsprechenden Endkonzentrationen.

Tab. 2.3: Verwendete Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	Arbeitslösung	
		<i>E. coli</i>	<i>C. acetobutylicum</i>
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	-
Chloramphenicol	35 mg/ml in EtOH (96 % (v/v))	35 µg/ml	-
Thiamphenicol	20 mg/ml in EtOH (96 % (v/v))	-	20 µg/ml
Tetracyclin	20 mg/ml in EtOH (70 % (v/v))	20 µg/ml	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml	-
Clarithromycin	5 mg/ml in EtOH (96 % (v/v))	-	5 µg/ml
5-Fluorouracil	200 mg/ml in DMSO	-	200 µg/ml
Polymyxin B	40 mg/ml in H ₂ O	40 µg/ml	-
Thymidin	50 mM in H ₂ O	-	50 µM
Lysozym	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	100 µg/ml
Proteinase K	40 mg/ml in H ₂ O	40 µg/ml	40 µg/ml

2.3 Zellanzucht, Stammhaltung und Reinheitskontrolle

2.3.1 Zellanzucht von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 aus der Stammkultur

Zur Analyse der Kulturüberstände sowie für spätere Transkriptionsanalysen wurde *C. acetobutylicum* aus der Stammkultur angeimpft. Dabei erwies es sich als Vorteil,

die Sporensuspension zunächst auf CG-Festmedium auszuplattieren und bei 37°C im Anaeroben-Topf über Nacht zu inkubieren. Am darauffolgenden Tag wurde eine Einzel-Kolonie zum Beimpfen einer Anaerobenflasche, gefüllt mit 50 ml CG-Medium, verwendet. Die Inkubation dieser Vorkultur erfolgte bei 37°C und 180 U/min auf dem Rotationsschüttler. Sie diente im weiteren Verlauf als Ausgangskultur für das Beimpfen einer mit 200 ml CG-Medium gefüllten Hauptkultur.

2.3.2 Zellanzucht in Flüssigkulturen

Für die Zellanzucht von *C. acetobutylicum* in Flüssigkultur wurde zumeist CG-Medium verwendet. Nach dem Autoklavieren der thermostabilen Komponenten, erfolgte die Zugabe der zuvor sterilfiltrierten Lösungen von Glukose, Asparagin und $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ bei einer Temperatur von ca. 50°C. Die Anaerobenflasche wurde mit einem Butyl-Stopfen verschlossen und unter mehrfachem Schwenken mit Stickstoff überschichtet. Um ein Absetzen der Zellflocken am Boden der Kulturflasche zu vermeiden, erfolgte die Inkubation der Flüssigkulturen bei 37°C und 180 U/min auf dem Rotationsschüttler.

2.3.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in *C. acetobutylicum*

Die minimale Hemmkonzentration, kurz MHK, ist die kleinste Wirkstoffkonzentration einer Substanz, die ein Bakterienwachstum verhindert. Für die Überprüfung der MHK einzelner Antibiotika auf *C. acetobutylicum* wurden 6 ml CG-Medium mit individuell festgelegten Konzentrationen der Substanz unter Verwendung von Hungate-Röhrchen vorbereitet. Es folgte ein gleichmäßiges Beimpfen aller Teströhrchen mit 200 µl einer Vorkultur aus der logarithmischen Wachstumsphase. Als Kontrolle diente ein unbehandeltes CGM-Röhrchen. Die Inkubation der Hungate-Röhrchen erfolgte für mehrere Tage bei 37°C auf dem Rotationsschüttler. In gleicher Weise wurde die MHK auf CGM-Platten bestimmt.

2.3.4 Zellanzucht von *Escherichia coli*

Soweit keine anderen Angaben vorliegen, wurde *E. coli* in LB-Medium bei 37°C und unter Schütteln in Reagenzgläsern oder Schikanekolben angezogen. Mit Hilfe der Schikanekolben konnte eine optimale Belüftung des Stammes erzielt werden. Bei einem Kulturvolumen bis zu 10 ml erfolgte das Beimpfen mit einer Einzelkolonie, wohingegen bei größeren Kulturvolumina mit einer Vorkultur gearbeitet wurde. Hierfür diente 1 % Volumen der Hauptkultur ausgehend von einer Vorkultur zu dem Beimpfen derselbigen. Die Zellanzucht von *E. coli* auf Festmedium erfolgte bei 37°C im Brutraum.

2.3.5 Stammhaltung

Für eine Lagerung bis zu 4 Wochen wurden häufig benötigte Stämme von *E. coli* auf Agarplatten angezogen und bei 4°C aufbewahrt. Um eine Austrocknung der Platten zu vermeiden, wurden diese mit Parafilm verschlossen. Zur Gewährleistung einer Langzeitlagerung wurden Stammkulturen mit Glycerin angelegt. Dafür wurden 850 µl einer Vorkultur mit 350 µl 87 %igem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Für die Herstellung einer Stammkultur von *C. acetobutylicum* wurde die Sporenbildung des Organismus ausgenutzt. Hierfür wurden 200 µl einer logarithmischen Kultur auf CGM-Platten mit gegebenenfalls Antibiotika ausplattiert und im Anaeroben-Topf bei 37°C für eine Woche inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen mit Hilfe eines Drigalski-Spatels und 5 ml CG-Medium abgeschwemmt, in 2 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und bei -70°C gelagert.

2.3.6 Reinheitskontrolle

Eine Reinheitsüberprüfung der Kulturen erfolgte durch mikroskopische Kontrolle (Zellform), Vereinzlungsausstriche auf Komplexnährböden (Koloniemorphologie) unter Selektionsdruck in Form von Antibiotika. Darüber hinaus wurde die 16S rRNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kontrolliert.

2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA

2.4.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzebeständigen Lösungen und Geräte wurden zur Inaktivierung von Nukleasen für 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol behandelt und anschließend mit sterilem H₂O bidest. gespült. Bei thermolabilen Lösungen erfolgte eine Sterilfiltration (Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm, Sartorius, Göttingen). Im Folgenden ist eine Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer gezeigt.

Calciumchlorid-Lösung

CaCl₂ 100 mM

Na-EDTA-Lösung (pH 8,0)

Na-EDTA 500 mM

pH-Wert mit NaOH einstellen

Perchlorat-Lösung

NaClO₄ 5 M

Phosphatpuffer (pH 7,5)

Na₂HPO₄ 50 mM

pH-Wert mit 50 mM KH₂PO₄ einstellen

SDS-Lösung

Natriumdodecylsulfat 10 % (w/v)

STE-Puffer (pH 8,0)

Saccharose 6,7 % (w/v)

Tris 50 mM

EDTA 1 mM

20x TAE-Puffer (DNA-Gelelektrophorese)

Tris	96,9	g
Essigsäure (100 %)	22,8	ml
EDTA	3,8	g
H ₂ O	ad 1000	ml

TE-Puffer (pH 8,0)

Tris	10	mM
EDTA	1	mM

Tris-Puffer (pH 8,0)

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

pH-Wert mit HCl einstellen

2.4.2 Präparation und Nachweis von DNA

2.4.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* (Bertram and Dürre, 1989; mod.)

Für die Isolierung chromosomaler DNA wurde das Pellet einer 10 ml Übernachtkultur in 1 ml STE-Puffer aufgenommen und bei 13.000 U/min, -4°C für 5 min gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Pellets in 550 µl STE-Puffer. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 120 µl Lysozym (40 mg/ml) und einer Inkubation von 30 min bei 37°C aufgeschlossen. Der Inkubationsansatz wurde im Anschluss mit 84 µl 10 %igem SDS, 72 µl 0,5 M Na-EDTA (pH 8) und 6 µl 1 M Tris-HCl (pH 8) versetzt und gut vermischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation der RNAase A (10 mg/ml) bei 100°C wurden 15 µl derselbigen dem Ansatz zugefügt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min. Nach Abschluss dieser Inkubation wurde dem Ansatz 30 µl Proteinase K (2,5 mg/ml) hinzugefügt. Die Proteolyse erfolgte für 3 Stunden bei 37°C. Nach der Zugabe von 180 µl 5 M Na-Perchlorat wurde der Ansatz gut vermischt, für 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und anschließend einer Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion unterzogen. Dabei wurde der DNA-haltigen Lösung 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol hinzugefügt und der Ansatz gevortext. Nach einer

Zentrifugation von 5 min bei 9.000 U/min konnte die obere DNA-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Zur vollständigen Reinigung der DNA wurde die Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion ein zweites- oder sogar drittes Mal wiederholt, bevor sich eine Isopropanol-Fällung anschloss. Hierbei wurde die DNA-haltige Lösung mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und nach mehrmaligem Schwenken bei 9.000 U/min für 30 min pelletiert. Es schloss sich ein Waschschrift der DNA mit 1 ml kaltem 70 %igem Ethanol (v/v) an. Die Zentrifugation erfolgte bei 9.000 U/min für 10 min. Im weiteren Verlauf wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet bei 37°C im Thermoblock getrocknet und anschließend in 100 µl sterilem H₂O bei 4°C gelöst. Eine Langzeitlagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.4.2.2 Isolierung genomischer DNA mit Hilfe des „Master Pure DNA Purification Kits“ (Fa. Epicentre, Madison, U.S.A)

Für eine schnellere Aufreinigung der genomischen DNA aus *C. acetobutylicum* wurde das „Master Pure DNA Purification Kit“ (Fa. Epicentre, Madison, U.S.A) verwendet. Hierbei wurde zunächst 1 ml einer Übernachtskultur bei 11.000 U/min für 1 min zentrifugiert, das Pellet in 150 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend mit 30 µl Lysozym (20 mg/ml) versetzt. Der Ansatz wurde gut vermischt und 30 min bei 37°C inkubiert, bevor die Zugabe von 180 µl „2 x T & C Lysis Solution“, versetzt mit 1 µl Proteinase K, erfolgte. An eine 15 min Inkubation bei 65°C mit gelegentlichem Vortexen des Ansatzes, schloss sich eine Inkubation auf Eis an. Um eine Degradation der RNA zu gewährleisten, wurde dem Ansatz 1 µl RNase A hinzugefügt, gut vermischt und anschließend bei 37°C für 30 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 210 µl „MPC Protein Precipitation Reagent“ und mehrfaches vortexen. 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 unterzogen werden. Dabei wurden 500 µl Isopropanol dem Ansatz hinzugefügt, unter mehrfachem Invertieren gut vermischt und im darauffolgenden für 10 min bei 4°C und 11.000 U/min zentrifugiert. Die pelletierte DNA konnte nun mit 500 µl 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen werden. Hierzu erfolgte eine Zentrifugation von 2 min bei 4°C und 11.000 U/min. Die Trocknung der DNA erfolgte bei 37°C im Thermoblock, bevor sie in 50 µl sterilem H₂O gelöst wurde.

2.4.2.3 Aufreinigung der Plasmid-DNA über Alkali/SDS-Lyse

Die Plasmidisolierung wurde mittels alkalischer Lyse und anschließender chromatographischer Aufreinigung durchgeführt. Dabei wurde ausgehend von 4 ml einer ÜN-Kultur eine Isolierung unter Verwendung des „QIAprep® Spin Miniprep Kits“ der Firma QIAGEN nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.4.2.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus *C. acetobutylicum*

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *C. acetobutylicum* wurde eine modifizierte alkalische Lyse unter Verwendung des „QIAprep® Spin Miniprep Kits“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach der Zentrifugation von 4 ml einer ÜN-Kultur erfolgte die Resuspension des Pellets in 250 µl P1-Puffer. Dem Ansatz wurde gleiches Volumen P2-Puffer zugefügt und anschließend mit der doppelten Menge N3-Puffer (700 µl) versetzt. Für eine optimale Lyse der Zellen wurde der Ansatz durch mehrfaches Invertieren gut vermischt und im Folgenden für 10 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Um eine Fragmentierung der DNA zu vermeiden und die Scherkräfte zu minimieren erwies es sich als Vorteil, die selektive Bindung der Plasmid-DNA an die Säule bei geringerer Rotationsgeschwindigkeit durchzuführen. Hierbei wurde das Lysat 1 min bei 2.000 U/min zentrifugiert. Nach einer weiteren Behandlung der Säule mit 500 µl PB-Puffer und einer anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 5000 U/min, erfolgte das Waschen der Membran mit 750 µl PE-Puffer unter gleichen Zentrifugationsbedingungen. Für die Trocknung der Membran und die Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde die Rotationsgeschwindigkeit auf 10.000 U/min erhöht. Die Plasmid-DNA konnte in 30 µl sterilem H₂O aufgenommen werden. Mit Hilfe dieser Methode gelang es Plasmide aus *C. acetobutylicum* schnell zu isolieren und anschließend über Re-Transformation in *E. coli* DH5α zu bestätigen.

2.4.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Optimierung von Klonierungen und Sequenzierungen ist es erforderlich Nukleotide, Puffer und Enzymreste aus PCR-Ansätzen zu entfernen. Hierfür wurde das „QIAquick® PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

2.4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Größenbestimmung und die präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese mit unterschiedlich konzentriertem Agaroseverhältnis in Abhängigkeit der Fragmentgröße durchgeführt. Die Agarose (0,8 %ig-1,5 %ig) wurde in 1x TAE-Puffer, welcher auch als Laufpuffer diente, angesetzt, in vorgefertigte Gelapparaturen gegossen und mit einem Gelkamm versetzt. Nach Abkühlung der Agarose erfolgten die Übersichtung mittels des Laufpuffers und das Entfernen des Gelkammes. Die Proben wurden mit 1/6 Vol. *Loading Dye* versetzt, gut durchmischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Dabei diente der *Loading Dye* sowohl der Beschwerung der Probe als auch der Markierung der Lauffront. Bei einer konstant gehaltenen Spannung von 90-120 V für etwa 35-45 min erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe, da deren Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrer Molekularmasse ist. Mit Beendigung des Laufes erfolgte eine 10 minütige Färbung der DNA in einem Ethidiumbromid-Bad (100 µl Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml ad 100 ml H₂O). Nach Entfärbung im Wasserbad konnte die DNA mit Hilfe der Gel-Dokumentationsanlage unter UV-Licht (254 nm) aufgrund der Einlagerung des Ethidiumbromids fotografisch dokumentiert werden. Für eine Größen- und Mengenabschätzung diente ein mitgeführter Standard der Marke GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot). Somit konnten Fragmentgröße zwischen 0,25-10 kbp visualisiert werden.

2.4.2.7 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ der Firma QIAGEN war es möglich, DNA-Fragmente für Klonierungen und Sequenzierungen aus Agarosegelen zu isolieren. Nach der elektrophoretischen Auftrennung des zu isolierenden Fragments unter Zuhilfenahme des Agarose-Gels konnte die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht (254 nm) aus dem Gel extrahiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und gewogen werden. Die Isolierung des Fragments wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe des NanoDrop[®] ND 1000 Spektrophotometers der Firma Peqlab ist eine genaue Konzentrationsangabe von Nukleinsäuren möglich. Nach der Kalibrierung des Gerätes auf die verwendete Elutionslösung und die Überführung von 1 µl der Probe in eine winzige Aussparung der Apparatur analysiert das Spektrophotometer das Licht, ausgehend von einer Xenon Lampe, nachdem es die Probe passierte. Des Weiteren konnte die Reinheit der DNA anhand des Absorptionsverhältnisses bestimmt werden. Eine DNA gilt bei einem Absorptionsverhältnis von $OD_{260} : OD_{280} = 1,8$ als rein (Sambrook *et al.*, 1989), wobei Proteinverunreinigungen anhand einer stärkeren Absorption bei 280 nm zu erkennen sind.

2.4.2.9 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Zur Verifizierung einzelner PCR-Fragmente und Mutationsereignisse wurden die Nukleinsäuren sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger, Nicklen *et al.* 1992) mit Fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Die Sequenzierreaktionen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt.

2.4.3 Klonierungen von DNA-Fragmenten

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Klonierungstechniken angewandt. Neben der Ligation infolge eines Restriktionsverdau stellte die Hybridisierung von PCR-Amplifikaten eine weitere Alternative da.

2.4.3.1 Restriktion und Dephosphorylierung

Unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen wird die doppelsträngige DNA an spezifischen Basensequenzen geschnitten, wodurch einerseits glatte Enden, sogenannte *blunt ends*, oder andererseits überhängende Ende, sogenannte *sticky ends*, entstehen. Die Restriktionen mit Endonukleasen wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und der Temperatur durchgeführt. Die Enzymmenge und Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge und dem Reaktionsvolumen. Eine Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte für 15 min bei 65°C auf dem Thermoblock.

Die Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) unter Einsatz des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Es ist eine Methode, die eine Religation nach dem Restriktionsverdau des DNA-Vektors vermeidet. Einem Ansatz mit einer DNA-Endkonzentration von ca. 3-10 ng/µl wurde 1 µl CIAP (1000 Units/µl) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C, wobei anschließend erneut 1 µl CIAP dem Ansatz beigefügt wurde. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde das Enzym mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ aus dem Ansatz entfernt. Im Folgenden konnte die aufgereinigte DNA für eine Ligation eingesetzt werden.

2.4.3.2 Ligation

Infolge einer Restriktion von DNA-Fragmenten und Vektoren mit gleichen Restriktionsendonukleasen entstehen komplementäre Ende, welche im Zuge der Ligation miteinander verknüpft werden. Hierbei werden 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen unter Entstehung von Phosphodiesterbrücken miteinander verbunden. Das dafür notwendige Enzym, die T4-DNA-Ligase (Fermentas), wurde

im Reaktionsansatz in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 16°C über Nacht in einem Thermocycler inkubiert. Dabei lag das Insert-DNA-Fragment im 3-5-fachen molarem Überschuss gegenüber dem Vektorfragment vor. Eine Inaktivierung der T4-DNA-Ligase wurde am darauffolgenden Tag für 15 min bei 65°C durchgeführt.

2.4.3.3 „TOPO-TA“-Klonierung

Die „TOPO-TA“-Klonierung der Firma Invitrogen erwies sich im Laufe dieser Arbeit ebenfalls als geeignete Methode zur direkten Klonierung von DNA-Fragmenten mit 3'-Adenosinüberhängen. Infolge einer *Taq*-Polymerase-Reaktion werden 3'-Adenosinüberhänge an dem Insert generiert. Während eine Topoisomerase I 3'-Thymidinüberhänge an der Vektor-DNA erzeugt und anschließend kovalent mit der 3'-Phosphatgruppe des verdauten DNA-Fragments verbunden bleibt, ist eine Anlagerung der 3'-Adenosinüberhänge des Fragmentes möglich. Des Weiteren gewährleistet die angelagerte 5'-Hydroxylgruppe die Verknüpfung zweier DNA-Doppelstränge, in dessen Folge die Topoisomerase I freigesetzt wird (Shuman 1994). Folgender Reaktionsansatz wurde für die „TOPO-TA“-Klonierung pipettiert und anschließend für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Reaktionsansatz:

DNA	4	µl
Vektor pCR4 TOPO	1	µl
<i>Salt Solution</i> (1:4 verdünnen)	1	µl

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz vollständig den auf Eis gelagerten kompetenten *E. coli* TOPO Zellen hinzugefügt und eine Transformation nach Hersteller-Beschreibung durchgeführt. Eine Selektion der positiven Transformanten erfolgte auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C.

2.4.3.4 Hybridisierung von DNA-Fragmenten

Neben der Ligation, der Verwendung von Restriktionsendonukleasen und der „TOPO-TA“-Klonierung ist die Hybridisierung von DNA-Fragmenten eine weitere Methode zur Klonierung. Das Erstellen von Fusionen basierend auf PCR-

Fragmenten erfolgte durch die SOE-PCR (s. 2.7.4) (*splicing with overlap extensions*) (Heckman and Pease 2007). Für die Amplifizierung zweier DNA-Fragmente dienten vier verschiedene Oligonukleotide als Grundlage. Die Oligonukleotide, auf deren Basis die DNA-Fragmente fusionieren, generierten jeweils am 5'-Ende die invers komplementäre Sequenz des anderen Oligonukleotids. Die dadurch entstandenen Überhänge der beiden DNA-Fragmente waren Voraussetzungen für deren Fusion infolge der Hybridisierung unter Verwendung des folgenden Hybridisierungsprogrammes. Für die Erstellung der DNA-Fragmente wurde die Phusion® DNA-Polymerase der Firma Finnzymes verwendet.

Hybridisierungsansatz:

1. Vektorfragment	20 ng / kbp
2. Vektorfragment	20 ng / kbp
1. Insertfragment	20 ng / kbp
2. Insertfragment	20 ng / kbp
100 mM Tris-HCl (pH 8,5)	5 µl
100 mM EDTA	1 µl
2,5 M NaCl	2 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Hybridisierungsprogramm:

1	Denaturierung	3 min	95°C
2	Hybridisierung	2 min	65°C
3	Hybridisierung	15 min	35°C
	Schritte 2-3 3x wiederholen		

An die Hybridisierungsreaktion schloss sich die Transformation des Reaktionsansatzes in chemisch kompetente *E. coli* Zellen an. Eine Selektion der positiven Transformanten erfolgte auf LB-Platten unter Verwendung des entsprechenden Antibiotikums bei 37°C.

2.4.4 DNA-Transfer

Im Zuge dieser Arbeit fanden verschiedene Techniken wie Konjugation und Transformation zur Übertragung der DNA in Prokaryonten Anwendung.

2.4.4.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen und deren Anwendung

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen basierte auf einer Modifikation der Methode von Lederberg und Cohen (Lederberg and Cohen 1974). Dabei fanden die Stämme *E. coli* DH5 α , *E. coli* S17-1 und *E. coli* ER2275 (pAN1) Anwendung. Zu Beginn wurden 100 ml LB-Medium mit ca. 3 ml einer *E. coli* Übernachtskultur beimpft. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bei 37°C und 180 U/min auf dem Rotationsschüttler. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wurden die Zellen bei 6000 U/min 0°C und für 5 min zentrifugiert, wobei der Überstand im weiteren Verlauf verworfen wurde. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 min bei 6000 U/min und 0°C an. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und anschließend mit 2 ml 87 %igem Glycerin versetzt. Nach der Herstellung von 200 μ l Aliquots konnten die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen bei -70°C gelagert werden.

Für die Transformation erfolgte zunächst das Auftauen der 200 μ l Aliquots auf Eis. Die Zugabe von Plasmid-DNA zog eine 30 minütige Inkubation auf Eis nach sich. Anschließend wurden die Zellen einem Hitze-Schock von 42°C für 30 sec ausgesetzt. Nach der Zugabe von 500 μ l LB-Medium erfolgte eine Regeneration der Zellen bei 37°C für 1 Stunde auf dem Rotationsschüttler, bevor sie auf Selektivmedium ausplattiert wurden.

2.4.4.2 Elektroporation von *C. acetobutylicum*

Um eine Degradation der Plasmid-DNA in *C. acetobutylicum* zu vermeiden, erfolgte zunächst eine *in vivo* Methylierung des Vektors in *E. coli* ER2275 (pAN1). Die kodierte Methyltransferase des *Bacillus subtilis* Phagen Φ 3T (Mermelstein and Papoutsakis 1993) auf dem Vektor pAN1 modifiziert die DNA so, dass keine

Restriktion durch die Restriktionsendonuklease *SatI* erfolgt. Des Weiteren kann pAN1 nicht in Gram-positiven Organismen replizieren, wodurch eine Transformation eines Plasmid-Gemisches in *C. acetobutylicum* möglich wird. Für eine möglichst erfolgreiche Elektroporation ist es von enormer Wichtigkeit, dass der zu transferierende Vektor frei von Verunreinigungen und Salzen ist. Aufgrund dessen schließt sich an die Methylierung des Vektors eine Dialyse auf einer Nitrocellulose-Membran (Fa. Millipore, Billerica, USA) an.

Notwendige Puffer für die Elektroporation

ET-Puffer

Saccharose	27,7	g
NaHPO ₄ x H ₂ O	0,032	g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,18	g
H ₂ O	ad 300	ml

ETM-Puffer

Saccharose	27,7	g
NaHPO ₄ x H ₂ O	0,032	g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,18	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	12,8	g
H ₂ O	ad 300	ml

Die Puffer werden, aufgrund der enthaltenen Saccharose, in mit Stickstoff begaste Müller-Krempel Flaschen sterilfiltriert.

Für die Elektroporation von *C. acetobutylicum*, basierend auf der Methode von Nakotte (Nakotte, Schaffer *et al.* 1998), war es notwendig eine Vorkultur, ausgehend von einer Stammkultur, zu beimpfen. Die Vorkultur diente am darauffolgenden Tag zum Beimpfen von 50 ml CG-Medium. Die Inkubation dieser Hauptkultur erfolgte bei 37°C auf dem Rotationsschüttler unter gelegentlicher Kontrolle der optischen Dichte. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 erfolgte die Überführung der bewachsenen Kultur im Anaerobenzelt in 50 ml Falcon-Tubes. Die Zellernte wurde bei 5000 U/min 4°C für 10 min durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und

das Pellet in 20 ml eiskaltem ETM-Puffer vorsichtig resuspendiert. Ein weiterer Waschschrift bei 5000 U/min 4°C für 10 min schloss sich an. Um die Transformationseffizienz nicht negativ zu beeinflussen oder einen Funkenschlag innerhalb der Küvette durch das vorhandene MgCl₂ x 6 H₂O hervorzurufen, wurde das Pellet mit 10 ml eiskaltem ET-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden bei 5000 U/min 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml eiskaltem ET-Puffer vorsichtig aufgenommen. Für die Elektroporation wurden 600 µl Zellen mit 2-8 µg Plasmid-DNA vermischt und anschließend in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Fa. Peqlab, Erlangen) mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt. Folgende Einstellungen wurden dabei gewählt:

Spannung	1,8	kV
Widerstand	600	Ω
Kapazität	50	µF

Die Zeitkonstanten beliefen sich dabei auf 6-19 msec. Der gesamte Elektroporationsansatz wurde in ein mit 5 ml CG-Medium gefülltes Hungate-Röhrchen überführt und für 5 Stunden bei 37°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Der Inkubation folgte eine Zentrifugation der Zellen bei 5000 U/min RT für 5 min. Die Überstand wurde entfernt, die Zellen im Reflux resuspendiert und auf CGM-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte im Anaeroben-Topf bei 37°C für 3-5 Tage.

2.4.4.3 Konjugation von *Bacillus licheniformis* MW3

Die Konjugation stellt eine weitere Technik für den Transfer von DNA dar. Für die Konjugation von *B. licheniformis* MW3 wird der Donorstamm *E. coli* S17-1 (Priefer, Simon *et al.* 1985) mit dem konjugativen Vektor pKVM1 verwendet. Chromosomen-integriert weist der Stamm *E. coli* S17-1 alle für die Ausbildung der Konjugation notwendigen Gene auf.

Bacillus licheniformis MW3 wurde ausgehend von der Stammkultur in 4 ml LSLB-Medium bei 37°C auf dem Rotationsschüttler über Nacht angezogen. Indes erfolgte die Anzucht von *E. coli* S17-1 mit dem Vektor pKVM1 in 4 ml LB-Medium,

supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin. Diese Vorkulturen dienten der Inokulation der Hauptkulturen am darauffolgenden Tag. Die Anzucht des Donorstammes *E. coli* S17-1 (pKVM1) erfolgte in 25 ml LB_{Amp}-Medium, wohingegen der Rezipientenstamm *B. licheniformis* MW3 in 10 ml LSLB-Medium ohne Antibiotikum angezogen wurde. Sowohl Donor- als auch Rezipientenstamm wurden bei 37°C und 160 U/min bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2 auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Für die Entfernung des Antibiotikums wurde 1 ml des Donorstammes nach der Zellernte mit LB-Medium bei 3000 U/min 4°C für 5 min gewaschen. Nach der Abnahme des Überstandes erfolgte die Zugabe des Rezipientenstammes in 1-2 fachem Überschuss. Die Resuspension des Donorzellpellets in der Rezipientensuspension zog einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000 U/min 4°C für 5 min nach sich. Das Zellpellet wurde in 300 µl LSLB-Medium resuspendiert und die Zellsuspension in die Mitte einer LSLB-Platte ohne Selektionsdruck pipettiert. Nach einem kurzen Antrocknen der Zellsuspension erfolgte die Inkubation der Platte bei 37°C über Nacht. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen mit Hilfe von 500 µl vorgewärmten LSLB-Medium abgeschwemmt und auf LSLB-Platten mit Polymyxin B und Erythromycin ausplattiert. Polymyxin B galt dabei der Selektion Gram-positiver Bakterien, wohingegen Erythromycin auf das Vorhandensein des Vektors selektiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30°C für 2-3 Tage.

2.4.4.4 Konjugation von *C. acetobutylicum*

Die Konjugation von *C. acetobutylicum* erfolgt in Anlehnung an die Triparentale-Mating Strategie. Donor-, Helfer-, und Rezipientenstamm gewährleisten dabei eine erfolgreiche Konjugation des zu mobilisierenden Vektors. Für die Konjugation wurde der Helferstamm *E. coli* HB101 mit dem Helferplasmid pRK2013 verwendet. Auf dem Vektor sind die für die Ausbildung der Konjugation notwendigen Gene lokalisiert. Als Donorstamm diente *E. coli* ER2275 mit dem Vektor pAN1 und dem zu mobilisierenden Plasmid. Das zu mobilisierende Plasmid wurde im Anschluss an seine Methylierung durch die Methyltransferase des *Bacillus subtilis* Phagen Φ3T mit Hilfe des Vektors pRK2013 in den Rezipientenstamm *C. acetobutylicum* konjugiert. Für die Anzucht des Helfer- und Donorstammes wurden je 300 µl einer Vorkultur für das Beimpfen von 10 ml LB-Medium mit Kanamycin und 10 ml LB-Medium,

supplementiert mit Chloramphenicol und Ampicillin, verwendet. Für die Anzucht des Rezipientenstammes erwies es sich als Vorteil eine logarithmische Vorkultur zu verwenden, da sich die Verdopplungszeiten von *E. coli* und *C. acetobutylicum* deutlich voneinander unterscheiden. Dabei wurden 20 ml CG-Medium ausgehend von einer logarithmischen Vorkultur beimpft und zusammen mit den Kulturen des Helfer- und Donorstammes bei 37°C und 160 U/min auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2-1,4 wurden je 1 ml des Helfer- und Donorstammes bei 3000 U/min 4°C für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet-Gemisch mit 1 ml LB-Medium gewaschen (3000 U/min 4°C für 5 min). Mit Hilfe des Waschschrilles wurden die zuvor verwendeten Antibiotika entfernt. Mit der Zugabe eines 1-5 fachen Überschusses des Rezipientenstammes konnten verschiedene Verhältnisse und deren Konjugationseffizienz getestet werden. Es folgte die Resuspension des Zellpellet-Gemisches aus Helfer- und Donorstamm in der Rezipientensuspension. Die Zellen wurden wiederum bei 3000 U/min 4°C für 5 min zentrifugiert, in 300 µl CG-Medium aufgenommen und auf eine CGM-Platte ohne Selektionsdruck pipettiert. Nach kurzem Antrocknen der Zellen erfolgte die Inkubation der Platte bei 37°C über Nacht. Abhängig von der Zelldichte auf der Platte am darauffolgenden Tag wurden 2-3 ml CG-Medium für das Abschwemmen der Zellmasse verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen von *C. acetobutylicum* vollständig im verwendeten Medium resuspendierten. Die Selektion der Konjuganten erfolgte auf CGM-Platten mit Polymyxin B und Clarithromycin. Aufgrund einer natürlichen Resistenz Gram-positiver Bakterien gegenüber Polymyxin B konnte unter Verwendung dieses Antibiotikums auf *C. acetobutylicum* selektiert werden. Clarithromycin galt der Selektion von Zellen mit dem zu mobilisierenden Vektor. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C für 3 Tage.

2.5 Standardtechniken für das Arbeiten mit RNA

2.5.1 Vorbehandlungen von Geräten und Lösungen

Um Kontamination mit den sehr stabilen und weit verbreiteten RNAsen zu vermeiden, ist ein sauberes und schnelles Arbeiten mit RNA unabdingbar. Alle für das Arbeiten mit RNA benötigten thermostabilen Lösungen, Geräte, Pipettenspitzen

und sonstige Materialien wurden dementsprechend durch 2-faches Autoklavieren bei 121°C 2 bar für 20 min sterilisiert. Zu Beginn und während der Arbeit wurde der Platz sowie verwendete Utensilien stets mit 70 %igen Ethanol (v/v) gereinigt und auf permanentes Tragen von Handschuhen geachtet.

Verwendete Puffer und Lösungen

5x DNase Puffer

MgSO ₄	25	mM
Na-Acetat, pH 5,0	500	mM

2x autoklaviert

10x MOPS-Puffer (pH 7,0)

MOPS	200	mM
Na-Acetat	50	mM
EDTA	10	mM

pH-Wert mit NaOH einstellen

Na-Acetat

Na-Acetat, pH 5,0	3	M
-------------------	---	---

2x autoklaviert

TE-Puffer (pH 8,0)

Tris	10	mM
EDTA	1	mM

2x autoklaviert

2.5.2 Isolation der RNA aus *C. acetobutylicum*

Für die Isolierung der Ribonukleinsäuren aus *C. acetobutylicum* ist schnelles und sauberes Arbeiten erforderlich. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit und der schnellen Degradation der RNA erfolgte der Zellausschluss mit Hilfe des Dismembrators unter Verwendung von flüssigem Stickstoff. Nach Erreichen der erwünschten Wachstumsphase wurden die Zellen zu je 30 ml Aliquots unter Zugabe von 10 ml

eiskaltem Methanol geerntet. Die Zentrifugation erfolgte bei -20°C 9000 U/min für 10 min. Im Anschluss konnten die Zellpellets bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C aufbewahrt werden. Für den Aufschluss wurden die Zellen zunächst in 1 ml TE-Puffer bei 9000 U/min -9°C für 5 min gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 500 μl TE-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Währenddessen erfolgte die Kühlung des Teflongefäßes mit enthaltener Chromstahlkugel des Dismembrators in flüssigem Stickstoff. Die Zellsuspension konnte im Anschluss in den mit flüssigem Stickstoff bedeckten PTFE-Zylinder pipettiert werden. Nach Verschließen des Zylinders wurde dieser in die Zelmühle eingespannt und die Zellen durch die enthaltene Chromstahlkugel bei 1600 U/min für 3 min aufgeschlossen. Im weiteren Verlauf wurde das entstandene weiße Zellpulver in den zuvor mit 40 μl Mercaptoethanol versetzten 4 ml RLT-Puffer des „RNeasy[®] Midi Kits“ (QIAGEN, Cat no. 75144) aufgenommen. Dieser ist aufgrund der hohen Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration stark protein-denaturierend und durch das enthaltene Mercaptoethanol RNase hemmend. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des „RNeasy[®] Midi Kits“ unter Anleitung des Herstellers. Abschließend wurde die RNA in 2x 150 μl RNase-freien H_2O eluiert und bei -70°C aufbewahrt.

2.5.3 DNase-Verdau

Für eine vollständige Hydrolyse der chromosomalen DNA wurde die zuvor isolierte RNA einem DNase-Verdau unterzogen. Dabei wurden folgende Komponenten in einen Reaktionsansatz pipettiert.

Reaktionsansatz:

Isolierte RNA	300	μl
5x DNase-Puffer	80	μl
DNase (10 U/ μl , Roche, REF 04716728001)	15	μl
RNase-freies H_2O	5	μl

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 28°C für 2 Stunden. Im Folgenden wurde die DNase bei 70°C für 10 min Hitze-inaktiviert und die RNA auf Vorhandensein chromosomaler DNA mit Hilfe einer PCR (s. 2.6.1) untersucht.

Durch spezifisch ausgewählte Primer sollte lediglich ein PCR-Amplifikat aus der mitgeführten Positiv-Kontrolle hervorgehen. Als Positivkontrolle diente die chromosomale DNA von *C. acetobutylicum*. Konnte nach einer Gelelektrophoretischen Auftrennung chromosomale DNA in der isolierte RNA nachgewiesen werden, wurde der DNase-Verdau wiederholt.

2.5.4 Extraktion und Fällung der RNA

Zur Entfernung von Protein-Verunreinigungen wurde die RNA einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion unterzogen. Zunächst erfolgte die Zugabe von 1 Vol. saurem Phenol. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin für 20 sec gevortext und anschließend bei 13.000 U/min für 2 min zentrifugiert, wodurch eine deutliche 2-Phasen-Trennung ersichtlich wurde. Die in der oberen wässrigen Phase befindliche RNA wurde vorsichtig von der proteinhaltigen Interphase getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24/1 (v/v)) diente im weiteren Verlauf der Entfernung des restlichen Phenols aus der RNA haltigen wässrigen Lösung. Wiederum wurde das Reaktionsgefäß für 20 sec gevortext und bei 13.000 U/min für 2 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend durch die Zugabe von 1/10 Vol. 3,3 M Na-Acetat (pH 5,0) und 2,5 Vol. -20°C kaltem unvergälltem Ethanol (96 %) über Nacht bei -20°C gefällt. Am darauffolgenden Tag schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 U/min -10°C für 30 min an. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen, wobei darauf zu achten war, dass die transparent bis weiß erscheinende RNA nicht durch den Sog der Pipette entfernt wurde. Es folgten drei Waschrritte mit -20°C kalten 70 %igem Ethanol bei 13.000 U/min -10°C für je 10 min. Der Ethanol wurde daraufhin von der pelletierten RNA entfernt und das Reaktionsgefäß in ein mit Zellstoff gefülltes und Aluminiumfolie verschlossenem Becherglas überführt. Bei einer Temperatur von 37°C trocknete die RNA für 30 min. Die Resuspension der RNA erfolgte in 40 µl RNase freiem H₂O für circa 2 Stunden auf Eis.

2.5.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop[®] ND 1000 Spektrophotometers der Firma Peqlab (s. 2.4.2.8) bestimmt.

2.5.6 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Eine Art der Qualitätskontrolle für RNA stellt die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese dar. Hierfür wurde 1 g Agarose in 72 ml RNase-freiem Wasser erhitzt bis ein vollständiges Lösen der Agarose stattfand. Nach dem Abkühlen der Agarose bis auf 60°C erfolgte die Zugabe von 10 ml 10x MOPS-Puffer und 18 ml Formaldehyd. Die Lösung wurde gut vermischt und unter dem Abzug in eine vorgefertigte Gelapparatur gegossen. Daraufhin konnte der Kamm gesetzt werden und das Gel aushärten. Für die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese wurden 1-10 µg RNA eingesetzt, die Proben bis auf 10 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt und anschließend mit 1 Vol. RNA-Auftragspuffer versetzt. Es folgte die Denaturierung der Proben bei 65°C für 15 min. Im weiteren Verlauf wurden die Proben für 2 min auf Eis inkubiert und das Gel mit 1x MOPS-Puffer überschichtet. Die Gelkammern wurden mit den Proben beladen und die elektrophoretische Auftrennung bei 100 V für 1 Stunde gestartet. Zur Größenbestimmung einzelner Transkripte diente ein identisch behandelte DIG-markierter RNA-Größenstandard (RNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled, Roche 1 526 529). Die RNA konnte unter UV-Licht fotografisch dokumentiert werden.

2.5.7 Reverse Transkription

Eine weitere Technik zur Qualitätsüberprüfung der RNA ist die reverse Transkription (s. 2.6.6). Durch spezifisch ausgewählte Primer und nach erfolgreicher reversen Transkription konnte ein PCR-Amplifikat nach elektrophoretischer Auftrennung und unter UV-Licht detektiert werden.

2.5.8 Northern-Blot

Eine Methode zur Untersuchung der Genexpression anhand der Detektion der RNA stellt die Northern-Blot Analyse (Alwine, Kemp *et al.* 1977) dar. Mit Hilfe der in der denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennten RNA, ihre Übertragung auf eine positiv-geladene Nylon-Membran und ihrer Detektion mit spezifisch markierten komplementären Gensonden konnten Transkripte verschiedener Stämme bestimmt werden. Die Northern-Blot Analyse erfolgte mit Hilfe des „DIG-Northern-Starter Kits“ (Roche, Cat. No. 12 039 672 910) nach Anleitung des Herstellers.

2.5.8.1 Erstellen der Gensonden

Das Erstellen der für die Northern-Blot Analyse benötigten spezifischen Gensonden erfolgte auf Basis einer PCR-Reaktion (s. 2.6.2). Dabei wies einer der Primer, die für die *in vitro* Transkription benötigte Erkennungssequenz (s. 2.5.8.2) der verwendeten T7 RNA-Polymerase auf. Die Gensonden wurden aufgereinigt (s. 2.4.2.5) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.5.8.2 *in vitro* Transkription der Gensonden

Im Zuge einer *in vitro* Transkription der Gensonden erfolgte die Markierung der RNA mit Digoxigenin-11-UTP unter Verwendung des 5x Labeling Mix und des optimierten Transkriptionspuffers. Vorausgesetzt für diese *in vitro* Transkription war die Primersynthese mit enthaltender Erkennungssequenz der T7 RNA-Polymerase.

Erkennungssequenz der T7 RNA-Polymerase:

TAATACGACTCACTATAGGGAGA

Lösungen für die *in vitro* Transkription

EDTA

EDTA 0,2 M

Doppelt autoklaviert, pH 8,0

Für die *in vitro* Transkription wurden 200 ng der aufgereinigten Gensonde in folgenden Reaktionsansatz eingesetzt.

Reaktionsansatz:

Gensonde	200	ng
5x Transkriptionspuffer	4	µl
5x Labeling Mix	4	µl
T7 RNA-Polymerase	2	µl
RNAse freies H ₂ O	ad 20	µl

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend für 1 Stunde bei 42°C auf dem Heizblock inkubiert. Die Degradation der Template-DNA erfolgte durch Zugabe von 2 µl DNase I und einer Inkubation von 15 min bei 37°C auf dem Heizblock. Nachdem die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt wurde, erfolgte die Lagerung der 500 bp großen markierten RNA-Sonde bei -70°C.

2.5.8.3 Untersuchung der Markierungseffizienz

Verwendete Lösungen und Puffer

Puffer I

Maleinsäure	0,1	M
NaCl	0,15	M
auf pH 7,5 einstellen		
Tween 20	0,3	% (v/v)

Maleinsäure-Puffer

Maleinsäure	0,1	M
NaCl	0,15	M
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen		

Detektions-Puffer

Tris-HCl 0,1 M

NaCl 0,1 M

auf pH 9 einstellen

1x Blocking-Lösung

10x Blocking-Lösung 5 ml

Maleinsäure-Puffer 45 ml

Frisch ansetzen und nicht autoklavieren

Antikörper-Lösung

Anti-Digoxigenin-AP 2,5 µl

1x Blocking-Lösung 25 ml

Frisch ansetzen und nicht autoklavieren

Für die Überprüfung und visuelle Quantifizierung der infolge der *in vitro* Transkription mit Digoxigenin-11-UTP (DIG) markierten RNA wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-5}) der Solchen mit RNase-freiem H₂O angelegt. Eine DIG-markierte Actin-RNA Probe stand dabei sowohl als Positiv-Kontrolle der Markierung wie auch als Hybridisierungsstandard zur Verfügung. Zu Beginn wurde je 1 µl der verdünnten RNA Proben sowie der Positiv-Kontrolle auf die positiv-geladene Oberfläche der Nylon-Membran (Roche, Cat. No 11 417 240 001) pipettiert. Nach kurzem Antrocknen erfolgte die Fixierung der Nukleinsäuren auf der Membran durch kovalente Quervernetzung für 1 min in Gegenwart von UV-Licht (302 nm). Unterdessen war darauf zu achten, dass die Oberfläche der Nylon-Membran mit den Nukleinsäuren nach unten in Richtung des UV-Lichtes neigte. Die Nylon-Membran wurde in ein Plastikgefäß überführt, mit 20 ml Puffer I überschichtet und auf einem Schwenktisch für 5 min gewaschen. Der Puffer I wurde entfernt und die Membran mit 10 ml 1x Blocking-Lösung benetzt. Während einer 30 minütigen Inkubation auf dem Schwenktisch konnten so unspezifische Bindungen an der Membran verhindert werden. Nach Entfernung der 1x Blocking-Lösung folgte die Zugabe von 10 ml Antikörper-Lösung, wobei das Anti-Digoxigenin AP an die DIG-markierte RNA binden konnte. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf dem Schwenktisch. Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wurde die Membran

2-mal mit je 20 ml Puffer I für 15 min gewaschen. Mit der Zugabe von 10 ml Detektionspuffer und einer Inkubation von 4 min konnte die Membran auf einen pH von 9,5 angepasst werden. Nach leichtem Antrocknen der Membran wurde diese mit 4 Tropfen des Chemilumineszenz Substrates CDP-Star benetzt, luftblasen-frei in Folie verschlossen und für 10 min unter Lichtverschluss inkubiert. Die enzymatische Dephosphorylierung des CDP-Star durch die alkalische Phosphatase (AP) konnte im Transilluminator (GE Healthcare ImageQuant™ 400) dokumentiert werden. Anhand der unterschiedlichen Signalstärken der verdünnten RNA Proben erfolgte eine visuelle Quantifizierung.

2.5.8.4 Übertragung und Detektion der RNA

Zu Beginn der Übertragung und Detektion der RNA wurde eine denaturierende-Agarosegelelektrophorese (s. 2.5.6) durchgeführt. Für die Überprüfung der RNA-Qualität und gleichzeitigen Blotting-Effizienz erwies es sich als Vorteil zwei identisch behandelte denaturierende-Agarosegelelektrophoresen (s. 2.5.6) parallel durchzuführen. Folglich konnte die RNA nach Inkubation im Ethidiumbromid-Bad vor und nach der Übertragung auf die Nylon-Membran fotografisch dokumentiert werden.

Zusätzlich verwendete Puffer und Lösungen

20 x SSC (pH 7,0)

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

pH-Wert mit HCl einstellen, autoklavieren

Waschpuffer I

20x SSC	10	ml
SDS	0,1	% (v/v)
H ₂ O	ad 100	ml

autoklavieren

Waschpuffer II

20x SSC	500	µl
SDS	0,1	% (v/v)
H ₂ O	ad 100	ml

autoklavieren

Für die Übertragung der RNA, dem sogenannten Blotten, auf die Nylon-Membran wurde diese und das benötigte Whatman-Papier auf die Größe des Formaldehyd-Gels zugeschnitten. Des Weiteren wurde eine um 0,5 cm kleinere Maske vorbereitet. Die Nylon-Membran wurde zunächst mit RNase-freiem Wasser befeuchtet, und anschließend mit dem Whatman-Papier in 10x SSC Laufpuffer geschwenkt. Nachdem sich das Whatman-Papier und die Nylon-Membran in selbiger Reihenfolge luftblasenfrei auf der porösen Membran der Blot-Apparatur befanden, wurde sie mit der leicht angefeuchteten Maske bedeckt. Das Formaldehydgel wurde mit der RNA-Seite nach unten auf die Maske gelegt und die Blot-Apparatur nach Anleitung des Herstellers zusammengesetzt. Als Laufpuffer diente 10x SSC-Puffer. Der RNA-Transfer erfolgte bei 7 Hg für 1 Stunde. Nach kurzem Antrocknen erfolgte die Fixierung der RNA auf der Membran durch kovalente Quervernetzung für 1 min in Gegenwart von UV-Licht (302 nm).

In Vorbereitung auf die Hybridisierung erfolgte das Lösen der DIG Easy Hyb Granula (Roche, Cat. Nr.11 796 895 001) in 64 ml RNase freiem H₂O bei 37°C. Daraufhin wurde eine beliebige Menge des Hybridisierungspuffers in einem Falcon-Röhrchen bei 68° im Hybridisierungsöfen für 1 Stunde vorgewärmt. Die RNA-tragenden Nylon-Membran wurde mit der RNA-Seite nach innen dem Falcon-Röhrchen zugefügt und eine Prähybridisierung für 30 min bei 68° vollzogen. Währenddessen erfolgte die Denaturierung der zuvor getesteten verdünnten RNA-Sonde (s. 2.5.8.3) bei 98°C für 5 min. Es folgte eine kurze Inkubation auf Eis, bevor sie vollständig der Hybridisierungslösung zugefügt wurde. Die Hybridisierung der Membran erfolgte bei 68°C über Nacht im Hybridisierungsöfen.

Am darauffolgenden Tag konnte die Hybridisierungslösung mit beinhaltenender RNA-Sonde entfernt und bei -20°C gelagert werden. Die Membran wurde 2-fach mit je 5 ml Waschpuffer I für 5 min unter konstantem Schwenken gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 5 ml vorgewärmten Waschpuffer II für 15 min bei 68°C im Hybridisierungsöfen.

Für die Detektion der RNA wurde die Nylon-Membran in ein Plastikgefäß überführt, mit 20 ml Puffer I bedeckt und für 5 min auf dem Schwenktisch gewaschen. Der Puffer wurde entfernt und durch 50 ml 1x Blocking-Lösung ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf dem Schwenktisch, wodurch unspezifische Bindungen der RNA-Sonde an die RNA verhindert wurden. Nach Entfernung der 1x Blocking-Lösung wurde die Membran mit 25 ml Antikörper-Lösung benetzt, wodurch die Anti-Digoxigenin alkalische Phosphatase (AP) an die DIG-markierte RNA-Sonde binden konnte. Ein Inkubationsschritt für 30 min auf dem Schwenktisch schloss sich an. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die DIG-markierte RNA-Sonde zu vermeiden, wurde die Membran 2-3-fach mit je 50 ml Puffer I für 15 min auf dem Schwenktisch gewaschen. Der Puffer wurde entfernt und die Membran aufgrund der Zugabe von 20 ml Detektionspuffer und einer Inkubation für 5 min auf pH 9,5 equilibriert. Nach kurzem Antrocknen der Membran mit Hilfe des Whatman-Papiers wurde diese mit wenigen Tropfen des Chemilumineszenz Substrates CDP-Star benetzt und luftdicht in einer Folie verschlossen. Daran knüpfte sich ein Inkubationsschritt von 10 min unter Lichtausschluss an. Die enzymatische Dephosphorylierung des CDP-Star durch die alkalische Phosphatase (AP) konnte im Transilluminator (GE Healthcare ImageQuant™ 400) dokumentiert werden.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.6.1 Standard-PCR

Für die Überprüfung der homologen Rekombination, der Untersuchung auf DNA-Reste im Reaktionsansatz und der Verifizierung einzelner Klonierungsschritte wurde die Standard-PCR durchgeführt. Mit Hilfe der Hot Start Phire™ DNA-Polymerase und ihrem dazugehörigen Puffer (Finnzymes) konnten Produkte bis zu 2 kbp problemlos amplifiziert werden.

Reaktionsansatz:

dNTP-Mix (10 mM)	1	µl
Phire DNA-Polymerase	0,5	µl
5x Phire Puffer	5	µl
Primer 1 (5 µM)	4	µl
Primer 2 (5 µM)	4	µl
Template-DNA	100	ng
H ₂ O	ad 25	µl

PCR-Programm:

1	Denaturierung	98°C	2 min
2	Denaturierung	98°C	10 sec
3	Annealing	T _m -5	10 sec
4	Elongation	72°C	20 sec/kbp
5	Schritte 2-5 29x wiederholen		
6	Elongation	72°C	1 min
7	Hold	16°C	Forever

2.6.2 PCR zur Erzeugung von Northern-Blot Sonden

Aufgrund einer sehr geringen Fehlerrate während der Amplifikation wurde die Phusion[®] DNA-Polymerase mit dem zugehörigen Puffer (Finnzymes) für das Erstellen der Gensonden verwendet. Das Amplifikat wies dabei eine Größe von 500 bp auf.

Reaktionsansatz:

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

PCR-Programm:

1	Denaturierung	98°C	5 min
2	Denaturierung	98°C	30 sec
3	Annealing	T _m -5	30 sec
4	Elongation	72°C	30 sec/kbp
5	Schritte 2-5 29x wiederholen		
6	Elongation	72°C	10 min
7	Hold	16°C	Forever

2.6.3 GeneSOEing-PCR

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedenste Deletionskonstrukte mit Hilfe der GeneSOEing-PCR (Horton *et al.*, 1989) erzeugt. Für die Amplifikation der 500-2000 bp großen Fragmente diente die Phusion[®] DNA-Polymerase der Firma Finnzymes.

Erstellung der Flanken

Reaktionsansatz:

dNTP-Mix (10 mM)	1	µl
Phusion DNA-Polymerase	1	µl
5x Phusion Puffer	10	µl
Forward Primer Flanke A / B (5 µM)	4	µl
Reverse Primer Flanke A / B (5 µM)	4	µl
Template-DNA	100	ng
H ₂ O	ad 50	µl

Nach Erstellung der Flanken wurden diese mit Hilfe des „QIAquick[®] PCR Purification Kits“ der Firma QIAGEN aufgereinigt und für die Fusions-PCR eingesetzt.

Fusion der Flanken

Reaktionsansatz:

dNTP-Mix (10 mM)	1	µl
Phusion DNA-Polymerase	1	µl
5x Phusion Puffer	10	µl
Forward Primer Flanke A (5 µM)	4	µl
Reverse Primer Flanke B (5 µM)	4	µl
Flanke A	100	ng
Flanke B	100	ng
H ₂ O	ad 50	µl

PCR-Programm:

1	Denaturierung	98°C	5 min
2	Denaturierung	98°C	30 sec
3	Annealing	T _m -5	30 sec
4	Elongation	72°C	30 sec/kbp
5	Schritte 2-5 29x wiederholen		
6	Elongation	72°C	10 min
7	Hold	16°C	Forever

2.6.4 SOE-PCR

Für die Erstellung der DNA-Fragmente wurde die Phusion[®] DNA-Polymerase und die mitgeführten Puffer der Firma Finnzymes verwendet.

Erstellung der DNA-Fragmente

1. Reaktionsansatz:

dNTP-Mix (10 mM)	1	µl
Phusion DNA-Polymerase	1	µl
5x Phusion Puffer	10	µl
Fwd Primer Flanke A (5 µM)	4	µl
Rev Primer Flanke A mit Überhang zu B (5 µM)	4	µl
Template-DNA	100	ng
H ₂ O	ad 50	µl

2. Reaktionsansatz:

dNTP-Mix (10 mM)	1	µl
Phusion DNA-Polymerase	1	µl
5x Phusion Puffer	10	µl
Fwd Primer Flanke B mit Überhang zu A (5 µM)	4	µl
Rev Primer Flanke B (5 µM)	4	µl
Template-DNA	100	ng
H ₂ O	ad 50	µl

PCR-Programm:

1	Denaturierung	98°C	5 min
2	Denaturierung	98°C	30 sec
3	Annealing	T _m -5	30 sec
4	Elongation	72°C	30 sec/kbp
5	Schritte 2-5 29x wiederholen		
6	Elongation	72°C	10 min
7	Hold	16°C	Forever

Die DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des „QIAquick® PCR Purification Kits“ der Firma QIAGEN aufgereinigt und für die Hybridisierung (s. 2.4.3.4) eingesetzt.

2.6.5 Kolonie-PCR

Die Überprüfung der Deletionskonstrukte in *E. coli* Stämmen erfolgte mit Hilfe der Kolonie-PCR. Grundlage dieser Polymeraseketten-Reaktion war das Zellmaterial einer Einzelkolonie. Nach deren Resuspension in H₂O erfolgte die Lyse bei 98°C für 3 min. Für die Amplifizierung der PCR-Fragmente wurde die Hot Start Phire™ DNA-Polymerase der Firma Finnzymes eingesetzt.

Reaktionsansatz:

dNTP-Mix (10 mM)	1	µl
Phire DNA-Polymerase	0,5	µl
5x Phire Puffer	5	µl
Primer 1 (5 µM)	4	µl
Primer 2 (5 µM)	4	µl
H ₂ O	10,5	µl

PCR-Programm:

1	Denaturierung	98°C	3 min
2	Denaturierung	98°C	10 sec
3	Annealing	T _m -5	10 sec
4	Elongation	72°C	20 sec/kbp
5	Schritte 2-5 29x wiederholen		
6	Elongation	72°C	1 min
7	Hold	16°C	Forever

2.6.6 Reverse Transkription

Infolge der reversen Transkription wird die RNA mittels einer reversen Transkriptase in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben. Im weiteren Verlauf ist diese Grundlage für die Amplifizierung der PCR-Fragmente und somit ein Qualitätsnachweis der RNA. Im Zuge dieser Arbeit wurde das „QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit“ verwendet, in welchem reverse Transkription und Amplifizierung von PCR-Fragmenten in einem Schritt durchgeführt werden.

Reaktionsansatz:

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

PCR-Programm:

1	Reverse Transkription	50°C	30 min
2	Denaturierung	96°C	15 min
3	Denaturierung	96°C	30 sec
4	Annealing	59°C	30 sec
5	Elongation	72°C	3:30 min
6	Schritte 2-5 29x wiederholen		
7	Elongation	72°C	10 min
8	Hold	16°C	Forever

2.7 DNA-Microarrays

Für die Genexpressionsanalyse wird die RNA eines Standard- bzw. Referenzstammes unter den gewählten Wachstumsbedingungen isoliert und anschließend hinsichtlich des Expressionsverhalten verglichen. Die RNA (*target*) wird mit den fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen CyTM3 und CyTM5 (GE Healthcare, CyTM3-dctp, Cat no. PA53021, CyTM5-dctp, Cat no. PA55021) markiert und im weiteren Verlauf an die immobilisierten Nukleinsäuren (*probes*) auf der Oberfläche des Microarrays hybridisiert. Nach deren Hybridisierung werden die Fluoreszenzsignale der beiden Cyanin-Farbstoffen mit Hilfe eines GenePix 4000B Scanner (AXON Instruments, Union City, USA) detektiert.

2.7.1 Markierung der RNA mit den Fluoreszenz-Farbstoffen CyTM3/CyTM5

Die Markierung der RNA mit den Fluoreszenzfarbstoffen CyTM3/CyTM5 basierte auf einer reversen Transkription auf Grundlage von *random hexamer* Primern (Primer random p(dN)₆ Roche, REF 11034731001). Für eine Hybridisierungsreaktion wurden jeweils zwei Ansätze mit je 25 µg RNA CyTM3 und 25 µg RNA CyTM5 markiert. Zu Beginn der Markierung erfolgte das Annealen der *random Hexamere* an die RNA. Die einzelnen Komponenten des Ansatzes wurden auf Eis pipettiert, gut vermischt, kurz zentrifugiert und für 10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert.

Annealing-Ansatz:

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

Die Reaktion wurde durch eine kurze Inkubation auf Eis beendet und die Markierungsreaktion unter Lichtverschluss auf Eis gestartet. Für die reverse Transkription mit Hilfe der SuperScript® III Reversen Transcriptase (Invitrogen, Cat no. 18080-044) wurden folgende Komponenten dem Reaktionsansatz der Reihe nach zugesetzt:

Reaktionsansatz reverse Transkription:

Annealing-Ansatz	10	µl
5x <i>first strand buffer</i>	4	µl
DTT (0,1 M)	2	µl
dCTP Nukleotid Mix (4 mmol dCTP, je 10 mmol dATP, dTTP und dGTP)	2	µl
dCTP CyDye-markierte Nukleotide (Cy TM 3-dCTP / Cy TM 5-dCTP)	1	µl
SuperScript® III Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1	µl

Der Reaktionsansatz wurde vermischt, kurz zentrifugiert und für 3-4 Stunden bei 42°C im Thermocycler inkubiert. An die reverse Transkription schloss sich die

Hydrolyse der RNA an. Hierfür wurde dem Reaktionsansatz 2 µl 2,5 M NaOH zugesetzt und die RNA in kurze Oligomere hydrolysiert. Nach Vermischen des Ansatzes und einer kurzen Zentrifugation erfolgte die Inkubation bei 37°C für 15 min im Thermocycler. Im Anschluss wurde die Reaktion mit der Zugabe von 10 µl 2 M HEPES neutralisiert. Der Ansatz wurde gemischt und erneut kurz zentrifugiert.

2.7.2 Aufreinigung der markierten cDNA

Für die Entfernung der Template-RNA und der nicht eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe wurde eine Aufreinigung der cDNA mit Hilfe des „illustra™ CyScribe™ GFX™ Purification Kits“ durchgeführt. Für jeden Cyanin-Farbstoff wurde eine eigene Aufreinigungs-Säule verwendet. Zu Anfang wurde die Säule mit 500 µl *Capture Buffer* versetzt und der Markierungsansatz vorsichtig unter Lichtausschluss hinzugefügt. Nach Vermischen der Lösungen mit Hilfe einer Pipette erfolgte eine Zentrifugation des Ansatzes für 1 min bei 6000 U/min. In Folge dessen wurde die Bindung der markierten cDNA an die Säulenmatrix ermöglicht. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule gegeben und der Zentrifugationsschritt bei 13.000 U/min für 1 min wiederholt. Zur Entfernung ungebundener Fluoreszenzmoleküle wurde die Säule 3-mal mit je 600 µl Waschlösung für 30 sec bei 13.000 U/min gewaschen. Für die Trocknung der Säulenmatrix schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20 sec bei 13.000 U/min an. Die Elution der markierten cDNA von der Glasfaser Matrix der Säule erfolgte mit 40 µl eines auf 70°C erwärmten Elutionspuffers. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert, bevor sich eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 U/min anschloss. Die markierte cDNA konnte bis zur anschließenden Hybridisierung auf Eis oder bei -70°C gelagert werden.

2.7.3 Quantifizierung der markierten cDNA

Für die Bestimmung der Markierungseffizienz der cDNA wurden die Proben mit Hilfe des NanoDrop® ND 1000 Spektrophotometers der Firma Peqlab analysiert. Eine alternative Methode für die quantitative Kontrolle der Markierungsreaktion ist der *wavelength scan*. Dabei wurden 10 µl der markierten cDNA mit RNAse freiem

H₂O (1:6) verdünnt und das Absorptionsspektrum in einem Bereich von 500-700 nm in einer Quarzküvette (d = 1 cm) gemessen. Die Absorptionsmaxima von eingebautem CyTM3/CyTM5 liegen bei 550 bzw. 650 nm, wohingegen die freien Fluoreszenzfarbstoffe Absorptionsmaxima bei 520 bzw. 600 nm aufweisen. Es wurden die Extinktion bei 550 nm und 650 nm bestimmt und der Gehalt des eingebauten Fluoreszenzfarbstoffes mit Hilfe folgender Formel berechnet:

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

A = Absorption von Cy3 (550 nm) bzw. Cy5 (650 nm)

Z = eingesetztes Volumen markierter cDNA, (in µl)

F = Verdünnungsfaktor

E = Extinktionskoeffizient (Cy3 = 150000 x 1 mol⁻¹ cm⁻¹) bzw.
(Cy5 = 250000 x 1 mol⁻¹ cm⁻¹)

2.7.4 Hybridisierung markierter cDNA

Für die Hybridisierung markierter cDNA (*target*) an die immobilisierten Nukleinsäuren (*probes*) auf der Oberfläche der Microarrays wurde Tom-Freeman-Hybridisierungspuffer verwendet.

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

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

Für die Hybridisierung der *targets* wurden pro Fluoreszenzfarbstoff 80 pmol markierter cDNA eingesetzt. Die CyTM3 bzw. CyTM5 markierten cDNAs wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und für 5 min bei 98°C denaturiert. Nach einer

kurzen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe des Tom-Freeman-Hybridisierungspuffers bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 220 µl im Reaktionsansatz. Der Ansatz wurde gut vermischt und lichtgeschützt aufbewahrt. Der Microarray mit den darauf befindlichen *probes* wurde in eine Hybridisierungskammer eingespannt und der Reaktionsansatz mit Hilfe einer Hamilton-Spritze injiziert. Ein eigens angefertigtes Hybridisierungsprotokoll für *Clostridium acetobutylicum* ATCC 825 gewährleistete eine vollautomatische Hybridisierung mit Hilfe des *Automated Slide Processors*.

Hybridisierungsprotokoll:

00	Wait	<i>Check dummy slides</i> (Überprüfen, ob in jeder Kammer ein <i>dummy slide</i> ist)
01	Flush	Leeren der Schläuche und Kammern von alten Lösungen
02	Heat	Kammern auf 38°C aufheizen
03	Flush	Kammern mit Isopropanol spülen und leeren
04	Flush	Kammern mit Wasser spülen und leeren
05	Air Pump	Kammern für 60 sec mit Luft spülen
06	Heat	<i>Switch Off</i> -Heizung ausschalten
07	Prime	Schläuche mit <i>Wash 1</i> (Lösung 3) füllen
08	Wait	INSERT TEST SLIDES - Test <i>slides</i> einlegen
09	Heat	Kammern auf 45°C aufheizen
10	Wait	<i>Inject probe solution</i> – Proben-Lösung injizieren
11	Mix	Mischen der Lösungen in den Kammern für 12 Stunden
12	Flush	Mit <i>Wash 1</i> spülen
13	Heat	Kammern auf 45°C aufheizen
14	Mix	Mischen mit <i>Wash 1</i> für 10 min
15	Prime	Schläuche mit <i>Wash 2</i> (Lösung 4) füllen
16	Flush	Mit <i>Wash 2</i> spülen
17	Mix	Mischen mit <i>Wash 2</i> für 10 min
18	Flush	Mit <i>Wash 2</i> spülen
19	Mix	Mischen mit <i>Wash 2</i> für 4 min
20	Prime	Schläuche mit <i>Wash 3</i> (Lösung 2) füllen
21	Flush	Mit <i>Wash 3</i> spülen
22	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen

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

[Ende]

Erklärung der Programmbefehle:

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

Verwendete Lösungen:

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

2.7.5 Analyse der DNA-Microarrays mit GenePix Pro 6.0

Die Detektion der Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe (CyTM3 bzw. CyTM5) nach der Hybridisierung erfolgte mit Hilfe des Scanners GenePix 4000B (AXON Instruments, Union City). Die generierten Hybridisierungsdaten konnten anhand des Programmes GenePix Pro 6.0 analysiert werden. Auf dem Microarray befindliche Gene, die unten den gewählten Wachstumsbedingungen nicht reguliert waren, dienten als Standards zur Ermittlung der Scanstärke des Prescans (PMT 635 nm – Cy5, PMT 532 nm – Cy3). Dabei sollten die Fluoreszenzintensitätsstärken beider Farbstoffe in einem Spot in einem Verhältnis von 1:1 stehen. Ein weiterer Maßstab für die Bestimmung der Prescan Scanstärke war der Hintergrund des Microarray. Der Hauptscan wurde unter folgenden Einstellungen durchgeführt:

<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

Basierend auf der Software GenePix Pro 6.0 wurde der Microarray von einer Maske bedeckt, dessen Raster eine exakte Zuweisung der Annotation für jeden einzelnen Spot ermöglichte. Zu diesem Zweck wurde der auszuwertende Bereich jedes einzelnen Spots definiert. Anhand eines eigens dafür entwickelten Computer-Programmes (Ehrenreich, unveröffentlicht) konnte die Maske in Form eines *gal files* gefertigt werden. Entsprechend des *gal files* wurden spezifische Informationen über die Position des Gens auf dem Chip und dessen Annotation in Textformat ersichtlich. Die Fluoreszenzwerte, der Hintergrund, die Standardabweichung des Hintergrundes

beider Farbstoffe sowie die *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und der *Regression Ratio* für jeden einzelnen Spot wurden automatisch durch das Programm GenePix Pro 6.0 berechnet. Nach deren Berechnung wurden die Ergebnisse in Form eines Datenfiles und eines *Scatterplots* ersichtlich. Im Anschluss wurde die Hauptwolke der Gene im *Scatterplot* auf einen Regulationsfaktor von 1 normalisiert. Die Daten aus GenePix Pro 6.0 wurden in Form einer Excel File exportiert und für die weitere Analyse bearbeitet.

2.7.6 Auswertung der Transkriptionsdaten

Die Auswertung der normalisierten Transkriptionsdaten erfolgte anhand spezifischer Kriterien innerhalb des Excel Files (Microsoft, Redmond, USA). Zum einen wurden die Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe und die Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe abzüglich der Standardabweichung des Hintergrundes mit einem Wert größer null gefiltert. Ein weiteres Kriterium für eine qualitative Auswertung der Transkriptionsdaten wurde auf eine Abweichung der *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und der *Regression Ratio* von maximal 30 % festgelegt. Dadurch konnten methodische Artefakte ausgeschlossen werden. Gene mit einer Expressionsänderung um den Faktor 3 wurden gefiltert und hinsichtlich ihrer Funktion im Stoffwechsel verglichen.

2.8 Analyse der Kulturüberstände

Für die qualitative und quantitative Analyse acidogener und solventogener Lösungsmittel sowie für den quantitativen Nachweis der Glukose-Konzentration wurden Kulturproben zu unterschiedlichen Zeiten entnommen und bei 13.000 U/min -10°C für 10 min zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entnahme des Überstandes wurde dieser bis auf Weiteres bei -20°C gelagert.

2.8.1 Gas-Chromatographie

Die qualitative und quantitative Untersuchung acidogener und solventogener Lösungsmittel in den zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Kulturüberständen erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Schwarz (TU München).

Die Lösungsmittel konnten mit Hilfe des GC-2010 der Firma Shimadzu detektiert werden. Dabei wurde eine Stabilwax-DA-Säule und das Trägergas Stickstoff verwendet.

Alternativ wurden Kulturüberstände mit dem Chrompack CP 9001 Gaschromatographen (Chrompack, Frankfurt/Main) der Universität Rostock unter Leitung von Prof. H. Bahl quantifiziert. Wiederum diente Stickstoff als Trägergas.

2.8.2 Bestimmung der Glukose-Konzentration

Um den quantitativen Verbrauch von Glukose durch *C. acetobutylicum* in verschiedenen Wachstumsphase zu detektieren, wurde das „D-Glukose-HK Kit“ der Firma Megazyme verwendet. Die im Kulturüberstand enthaltene Glukose wird in Gegenwart von ATP durch das Enzym Hexokinase (HK) phosphoryliert, wodurch Glukose-6-Phosphat und ADP entstehen. In einem weiteren Reaktionsschritt wird das entstandene Glukose-6-Phosphat in Verbindung mit dem Enzym Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6P-DH) durch NADP^+ zu Glukonat-6-Phosphat oxidiert, wobei reduziertes NADPH entsteht. Basierend auf einer Absorptionszunahme bei 340 nm wird der NADPH-Gehalt photometrisch bestimmt. Da der NADPH-Gehalt und der Glukose-Gehalt sich einander stöchiometrisch verhalten, kann rückwirkend auf die Glukose-Konzentration geschlossen werden. Für die enzymatische Bestimmung der Glukose-Konzentration wurden die Proben 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt. Als Positiv-Kontrolle diente reines CG-Medium, welches aufgrund der hohen enthaltenen Glukose-Konzentration 1:1000 verdünnt werden musste. Um photometrische Ungenauigkeiten und Pipettierfehler ausschließen zu können, wurde von allen Proben eine dreifach-Bestimmung der Absorption im Bereich von 340 nm vorgenommen. Zu Beginn wurden folgende Komponenten in eine Küvette ($d = 1 \text{ cm}$) überführt:

Reaktionsansatz Leerprobe:

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	862	μl
Imidazolpuffer	43	μl
NADP^+ (150 mg) / ATP (440 mg)	43	μl

Der Ansatz wurde vermischt, 3 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 340 nm bestimmt.

Reaktionsansatz Kulturüberstand:

H ₂ O _{dest}	862	μl
Imidazolpuffer	43	μl
NADP ⁺ (150 mg) / ATP (440 mg)	43	μl
Kulturüberstand	43	μl

Nach Vermischen des Ansatzes und einer 3 minütigen Inkubation konnte die Absorption bei 340 nm gemessen werden (A1). Die enzymatische Reaktion wurde mit der Zugabe von 43 μl HK (425 U/ml)/G6P-DH (212 U/ml)-Lösung gestartet. Der Reaktionsansatz wurde vermischt, 5 min bei RT inkubiert und die Absorption ein weiteres Mal bei 340 nm gemessen (A2). Nach Bestimmung der Absorptionsdifferenz (A2-A1) abzüglich der Absorption der Leerprobe konnte $\Delta A_{D\text{-Glukose}}$ ermittelt werden. Für die Berechnung der D-Glukose-Konzentration wurde, unter Berücksichtigung der Verdünnung, folgende Formel verwendet:

$$c_{D\text{-Glukose}} = (V \times MW) / (\epsilon \times d \times v) \times \Delta A_{D\text{-Glukose}}$$

V = Gesamtvolumen (ml)

MW = Molekülmasse der D-Glukose (g/mol)

ϵ = Extinktionskoeffizient NADPH bei 340 nm ($6300 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

v = eingesetztes Probenvolumen (ml)

2.9 Bestimmung der H₂-Produktion

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 produziert durch die Vergärung von Kohlenhydraten acidogene (Butyrat, Acetat) und solventogene (Butanol, Aceton, Ethanol) Gärprodukte. Weitere Hauptgärungsprodukte sind Kohlendioxid (CO₂) und molekularer Wasserstoff (H₂). Für die quantitative Untersuchung der H₂-Produktion wurde der Bau eines modifizierten Glaszylinders bei der Glasbläserei Brennstein in Auftrag gegeben (s. Abbildung 2.1). Aus dem unteren Teil des modifizierten

Glaszylinders ragen zwei entgegengesetzt-läufige Ausgänge hervor. Mit Hilfe einer gasundurchlässigen flexiblen Schlauchverbindung, an dessen Ende eine Kanüle in eine anaerobe Kulturflasche führt, wird der Durchfluss produzierter Gase in den modifizierten Glaszylinder gewährleistet. Die eintretenden produzierten Gase (H_2 , CO_2) verdrängen die im modifizierten Glaszylinder befindliche Flüssigkeit, dessen Abfließen durch den zweiten Ausgang im Glaszylinder mit Hilfe eines verschließbaren Hahnes geregelt ist. Der obere Teil des skalierten Glaszylinders ist mit einem Drehverschluss und eines darin befindlichen Silikonstopfens verdichtet. Diese Öffnung ermöglicht das vollständige Befüllen des modifizierten Glaszylinders mit der Flüssigkeit. Für die alleinige quantitative Untersuchung der H_2 -Produktion wurde der Glaszylinder mit 0,1 M NaOH gefüllt. Das ebenso produzierte CO_2 wird folglich durch die 0,1 M NaOH-Lösung aufgenommen, wodurch Natriumcarbonat (Na_2CO_3) und H_2O entstehen. Eine anaerobe Kulturflasche, gefüllt mit 100 ml CG-Medium bzw. CG-Medium mit Clarithromycin, wurde mit Hilfe eines gasundurchlässigen flexiblen Schlauches und einer daran befindlichen Kanüle mit dem modifizierten Glaszylinder verbunden. Die Inkubation der anaeroben Kultur erfolgte schwenkend im Wasserbad bei $37^\circ C$. Die durch H_2 verdrängte 0,1 M NaOH-Lösung wurde in einem Standzylinder aufgefangen und das Volumen zu bestimmten Zeitpunkten detektiert. Als Kontrollen dienten mit H_2O bzw. 0,1 M NaOH-Lösung gefüllte Glaszylinder, welche mit definierten Volumen Kohlendioxid (Linde, Reinheit: 4.5 CO_2) und Wasserstoff (Linde, Reinheit: 5.0 H_2) begast und die verdrängten Volumen bestimmt wurden.

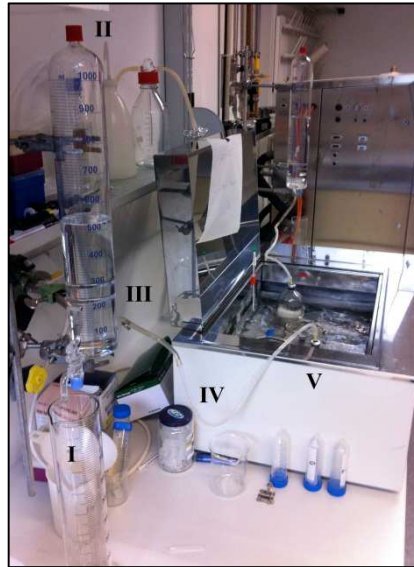


Abbildung 2.1: Aufbau der Apparatur zur quantitativen Bestimmung der H₂-Produktion.

- I Standzylinder mit darüber befindlicher Austrittsmöglichkeit verdrängter 0,1 M NaOH-Lsg.
- II modifizierter Glaszylinder mit enthaltener 0,1 M NaOH-Lsg.
- III Gaseinstrom
- IV Gasundurchlässige flexible Schlauchverbindung
- V anaerobe Kulturflasche schwenkend im 37°C beheiztem Wasserbad

2.10 Standardtechniken für das Arbeiten mit Proteinen

Verwendete Puffer und Lösungen

Kalium-Phosphat-Puffer (KP-Puffer)

K₂HPO₄/KH₂PO₄ 50 mM

pH 7,0; autoklavieren

DTT-Stammlösung

Dithiothreitol 200 mM

sterilfiltrieren

Benzylviologen-Stammlösung

Benzylviologen 500 mM

in KP-Puffer lösen; sterilfiltrieren

2.10.1 Zellaufschluss

Für die Messung der Hydrogenase-Aktivität in *Clostridium acetobutylicum* wurden die Zellen mit Hilfe der French-Press aufgeschlossen. Die Zellernte einer bewachsenen 200 ml Kultur CG-bzw. CG-Medium mit Clarithromycin erfolgte nach Erreichen einer OD_{600} von 2,0 bei 9000 U/min 4°C für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter stetiger Kühlung in 20 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,0; 15 mM DTT) vorsichtig aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine mit N₂-begaste Anaerobenflasche überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Für den Zellaufschluss wurde die vorgekühlte Bombe mit der Bakteriensuspension unter Zuhilfenahme einer 50 ml Spritze befüllt, wobei ein Schäumen der Suspension vermieden wurde. Nach Verschließen der Bombe mit Hilfe des Stempels wurde die noch eingeschlossene Luft über das Ablassventil herausgedrückt und dieses im Anschluss verschlossen. Eine gasdichte Schlauchverbindung mit anhängender Kanüle stellte die Verbindung zwischen Probenauslauf und einer mit N₂-begasten Anaerobenflasche dar. Demzufolge wurde der direkte Kontakt des Proteinrohextraktes zum Sauerstoff vermieden. Zudem konnte der Sauerstoff durch ein starkes Reduktionsmittel wie DTT abgefangen werden. Die eisgekühlte Bombe mit enthaltener Bakteriensuspension wurde in die French-Press eingespannt und der Zellaufschluss bei einem Zellinnendruck von 1400 bar (20000 psi) bei vier Wiederholungen durchgeführt. Besonders wurde auf eine stetige Kühlung und Vermeidung des direkten Sauerstoff-Kontaktes geachtet. Für die Entfernung der Zellreste wurde die Suspension bei 14.000 U/min 4°C für 30 min in einer Sorvall RC-5B Super Speed Zentrifuge zentrifugiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Anaerobenzelt in eine mit N₂-begaste Anaerobenflasche überführt und stets auf Eis gelagert.

2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford 1976)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt wurde die Methode nach Bradford durchgeführt. Die eingesetzte Bradford-Reagenz enthält ungebundenes Coomassie Brilliant Blue mit einem Absorptionsmaximum bei 470 nm. Bei einer Komplexbildung des roten ungebundenen Farbstoffes mit dem Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm und der Reaktionsansatz färbt sich blau.

Die Absorptionsänderung wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt. Als Proteinstandard wurde BSA (Bovine Serum Albumin) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung des Proteins wurde im linearen Bereich der BSA-Eichgerade durchgeführt.

2.10.3 Messung der Hydrogenase-Aktivität

Die quantitative Untersuchung der Hydrogenase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des Spektrophotometers VARIAN CARRY 100Scan. Aufgrund der O₂-Empfindlichkeit der Hydrogenasen und deren irreversible Schädigung, wurde der Proteinrohextrakt stets auf Eis gelagert und unter anaeroben Bedingungen aufbewahrt. Die Messung der Hydrogenase-Aktivität erfolgte anaerob unter einer H₂-Atmosphäre mit 0,5 M Benzylviologen als Elektronenakzeptor. Dazu wurde eine Quarzküvette (d = 1 cm) mit einem Stopfen versetzt und 5 min mit H₂ begast. Nach der Zugabe von 800 µl 50 mM KP-Puffer (pH 7,0; 15 mM DTT) wurden unterschiedliche Mengen Proteinrohextrakt in verschiedenen Reaktionsansätzen mit Hilfe einer Hamiltonspritze dem Ansatz zugefügt. Es folgte der photometrische Nullabgleich des Reaktionsansatzes gegenüber der Leerprobe (1 ml 50 mM KP-Puffer) bei 578 nm im Spektrophotometer. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 µl 0,5 M Benzylviologen gestartet und die Absorption bei 578 nm im Abstand von 10 sec photometrisch bestimmt. Die Messung der Absorptionsänderung erfolgte über einen Zeitraum von 5 min. Die spezifische Enzymaktivität wurde anhand des linearen Bereiches der Kinetik und der Proteinkonzentration berechnet.

$$\text{Volumen-Aktivität [U/ml]} = \frac{(V \times \Delta E/\text{min})}{(\epsilon \times d \times v)}$$

V	=	Gesamtvolumen (ml)
$\Delta E/\text{min}$	=	Extinktionsänderung pro Minute
ϵ	=	Extinktionskoeffizient von reduziertem Benzylviologen bei 578 nm ($8,65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
d	=	Schichtdicke (1 cm)
v	=	eingesetzte Menge Proteinrohextrakt (ml)

Unter Bezugnahme der Proteinkonzentration konnte die spezifische Enzymaktivität berechnet werden:

$$\text{spezifische Enzymaktivität [U/mg]} = \frac{\text{Volumen-Aktivität [U/ml]}}{\text{Proteinkonzentration [mg/ml]}}$$

Die unterschiedlichen Stämme wurden hinsichtlich ihrer spezifischen Enzymaktivitäten miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Modifikation der Expression der Hydrogenase HydA basierend auf der Antisense-RNA Technologie

Die Antisense-RNA Technologie ist eine effektive Methode, die Translation zu reduzieren. Mit dieser Strategie können auch Gene, deren Deletionen letal für den Organismus sind, hinsichtlich ihrer Rolle im Zentralstoffwechsel untersucht werden. Das Gen einer [FeFe]-Hydrogenase (*hydA*) wurde über Sequenzhomologien in *C. acetobutylicum* ATCC 824 identifiziert (Gorwa, Croux *et al.* 1996). Das monocistronische Operon des *hydA* Gens ist durch einen eigenen Promotorbereich mit Ribosomenbindestelle (RBS) und einen vermutlich rho-unabhängigen Transkriptionsterminator gekennzeichnet. Die chromosomale Orientierung des Hydrogenase Gens ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

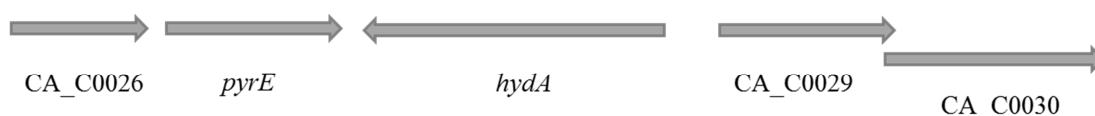


Abbildung 3.1: Chromosomale Orientierung des Hydrogenase Gens *hydA* mit seinen up- und downstream Bereichen

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht gelungen, das Gen der Hydrogenase HydA zu deletieren. In diese Arbeit sollte die Bedeutung der wasserstoffproduzierenden Hydrogenase für die Lösungsmittel-Produktion aufgeklärt werden. Mit Hilfe der Antisense-RNA Technologie sollte die Auswirkung einer Veränderung im Elektronenfluss durch die Reduzierung der Proteinmenge auf Translationsebene für die Solventogenese untersucht werden. Um eine optimale Repression der Translation zu erzielen, wurde das Gen der Hydrogenase in drei verschiedenen Längen amplifiziert und jeweils in Antisense-Orientierung kloniert. Der Leervektor pSOSzero wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Auswirkung einer reduzierten Hydrogenase HydA Menge sollte anhand der quantitativen Analyse der Hydrogenaseaktivität und der H₂-Produktion untersucht werden. Mit Hilfe gaschromatographischer Analysen sollten Veränderungen der Lösungsmittel-

Produktion detektiert werden. Durch Transkriptionsanalysen mit DNA-Microarrays wurden Unterschiede in der Genexpression in Abhängigkeit der Antisense-RNA Transkriptlänge charakterisiert.

3.1.1 Konstruktion der *hydA* Antisense-RNA Vektoren

Die Hydrogenase HydA nimmt infolge der H₂-Produktion und der damit verbundenen Bedeutung für den Redoxhaushalt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* ein. Das auf dem Chromosom lokalisierte Gen der Hydrogenase (*hydA*) wird ausgehend vom *sense*-Strang der DNA in mRNA transkribiert. Für die Konstruktion von Vektoren, die *antisense*-Transkripte des *hydA* Gens exprimieren, wurde das *high-copy* Plasmid pSOS95 verwendet. Der Vektor pSOS95 (Desai and Papoutsakis 1999) verfügt über zwei *origin of replications*. Mit Hilfe des ori *colE1* ist eine Replikation in *E. coli* möglich. Der ori pIM13 indes gewährleistet die Replikation in *C. acetobutylicum*. Des Weiteren ist der Vektor durch eine Ampicillin- und Clarithromycin-Resistenzkassette gekennzeichnet, wodurch die Selektion in beiden Bakterien ermöglicht wird. Das Antisense-RNA Konstrukt der Hydrogenase HydA wurde in drei verschiedenen Längen zwischen den Thiolase-Promotor und den Terminator der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) kloniert. Der starke konstitutiv regulierte Thiolase-Promotor aus *C. acetobutylicum* soll dabei die Transkriptmengen der Antisense-RNAs des *hydA* Gens erhöhen. Mit Hilfe der RNA-RNA Komplexbildung soll die Translation der Hydrogenase HydA fast vollständig unterbunden werden.

Für die Amplifikation der drei Antisense-RNA Konstrukte der Hydrogenase HydA durch die PCR wurde die chromosomale DNA von *C. acetobutylicum* als Matrize verwendet. Das längste Antisense-RNA Konstrukt umfasst, ausgehend vom Transkriptionsstart, 94 % des Gens. Infolge der Amplifikation mit den Oligonukleotiden HydA_fwd und HydA_rev wurde ein 1655 bp großes DNA-Fragment mit anhängenden Restriktionsschnittstellen der Enzyme *NarI* und *BamHI* generiert (s. Abbildung 3.2 B). Das DNA-Fragment wurde über genannte Restriktionsendonukleasen in den Vektor pSOS95 kloniert. Der daraus resultierende Vektor wurde als pDK1 bezeichnet (s. Abbildung 3.2 A).

Die Konstruktion des Vektors pDK2 basierte auf der Synthese eines Antisense-RNA Konstrukts der Hydrogenase unter Verwendung der Oligonukleotide HydA60_fwd

und HydA_rev. Ausgehend vom Transkriptionsstart umfasst das DNA-Fragment 60 % des Hydrogenase Gens (s. Abbildung 3.2 A). Das 1061 bp große DNA-Fragment (s. Abbildung 3.2 B) konnte aufgrund generierter Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *NarI* und *BamHI* verdaut und in den gleichermaßen geschnittenen dephosphorylierten Vektor pSOS95 ligiert werden.

Für die Konstruktion des Vektors pDK3 wurden die Oligonukleotide HydA30_fwd und HydA_rev mit den angefügten Restriktionsschnittstellen der Enzyme *NarI* und *BamHI* verwendet (s. Abbildung 3.2 A). Das DNA-Fragment umfasst, ausgehend vom Transkriptionsstart, lediglich 30 % des *hydA* Gens. Das infolge der Amplifikation entstandene 541 bp große DNA-Fragment (s. Abbildung 3.2 B) wurde unter Verwendung genannter Restriktionsendonukleasen in den gleichermaßen verdauten und desphosphorylierten Vektor pSOS95 kloniert.

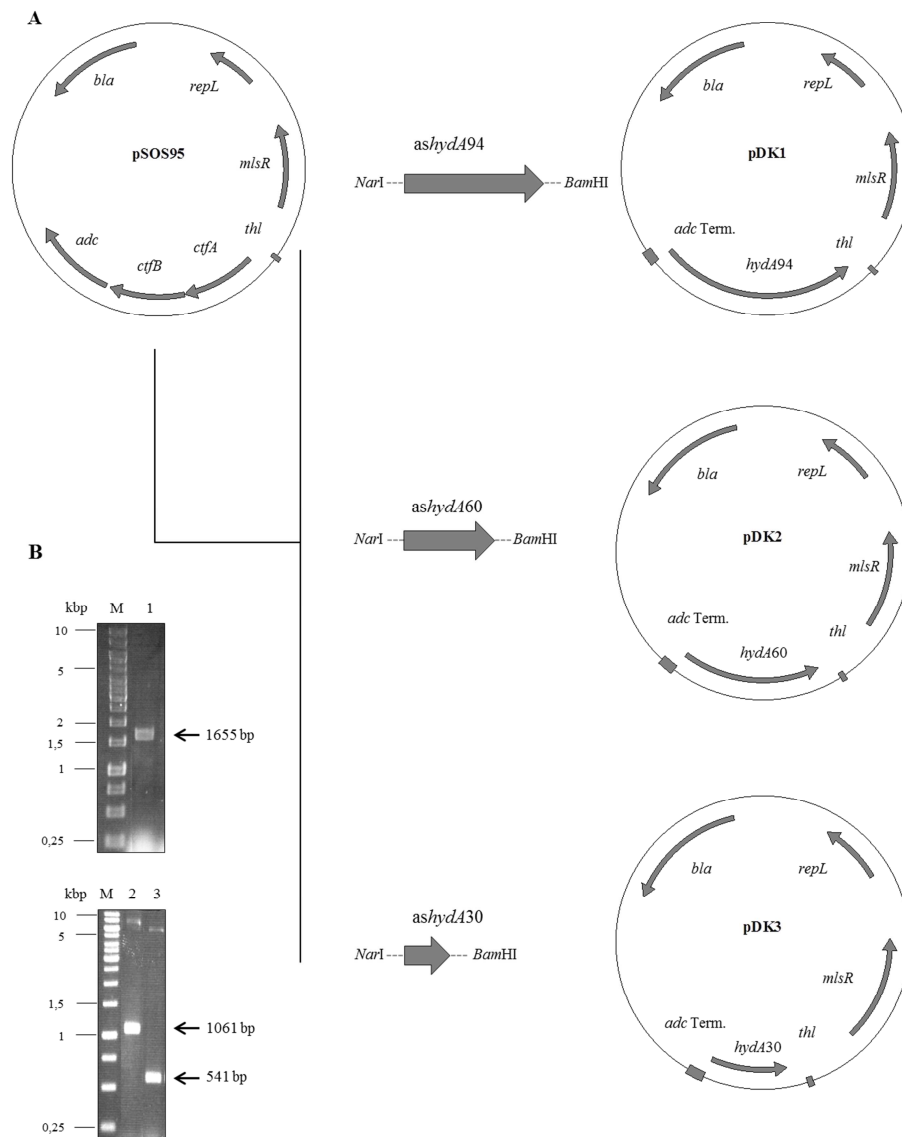


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Konstruktion der Antisense-RNA Vektoren pDK1, pDK2 und pDK3. A: Ausgehend vom Vektor pSOS95 erfolgte die Klonierung der drei verschieden langen Antisense-RNA Konstrukte über die Restriktionsschnittstellen *NarI* und *BamHI*. Die Antisense-RNA Konstrukte sind mit Hilfe von Pfeilen (dunkel-grau) gekennzeichnet. Die Größe der Pfeile entspricht der Länge der Antisense-RNA Konstrukte des Hydrogenase Gens (*ashydA94*, *ashydA60*, *ashydA30*). Der Promotor des Thiolase Gens (*thl*) ist mit Hilfe eines schwarzen Kastens markiert. *adc* Term. symbolisiert den Terminator der Acetoactetat-Decarboxylase (*adc*). **B:** Elektrophoretische Auftrennungen der amplifizierten Antisense-RNA Konstrukte; *ashydA94* (Spur 1), *ashydA60* (Spur 2) und *ashydA30* (Spur 3). M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Für vergleichende Experimente in Anwesenheit des Antibiotikums Clarithromycin war die Konstruktion eines Kontrollvektors erforderlich. Hierfür wurde die *SalI* Expressions-Kassette des Vektors pSOS95 entfernt und das verbleibende DNA-Fragment nach einer Gel-Extraktion ligiert. Mit Hilfe der Oligonukleotide DK3_fwd und DK4_rev erfolgte die Überprüfung des entstandenen Vektors pSOSzero, wie unter 2.7.1 beschrieben (s. Abbildung 3.3 A und B).

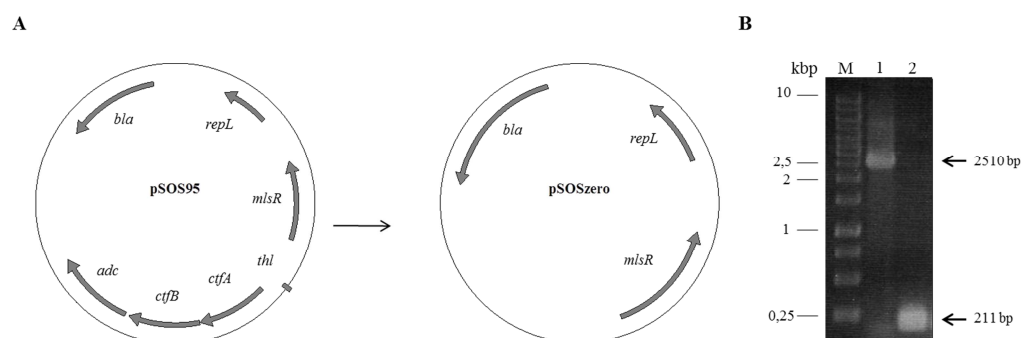


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Kontrollvektors pSOSzero. A: Entfernung der *SalI* Expressions-Kassette aus pSOS95 und die Entstehung des Vektors pSOSzero B: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze unter Verwendung der Oligonukleotide DK3_fwd und DK4_rev; die Amplifikation der Gene *ctfA*, *ctfB* und *adc* auf pSOS95 ergab ein 2510 bp großes DNA-Fragment (Spur 1); mit Entfernen der *SalI* Expressionskassette (pSOSzero) konnte ein 211 bp DNA-Fragment amplifiziert werden (Spur 2); M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

Die *hydA* Antisense-RNA Vektoren (s. Abbildung 3.2 A) sowie der Kontrollvektor pSOSzero (s. Abbildung 3.3 A) wurden nach ihrer Konstruktion durch Sequenzierung überprüft. Für deren Transfer in *C. acetobutylicum* via Elektroporation war eine Methylierung (s. 2.4.4.2) der konstruierten Vektoren erforderlich. Grund hierfür ist das Vorhandensein der Typ II Restriktionsendonuklease Cac824I in *C. acetobutylicum*. Diese Restriktionsendonuklease erkennt und schneidet spezifische Sequenzmotive (5'-GCNGC-3') (Mermelstein, Welker *et al.* 1992), wodurch die Transformationseffizienz rapide sinkt. Mit Hilfe der Methyltransferase Φ 3TI des *Bacillus subtilis* Phagen Φ 3T (Noyer-Weidner, Jentsch *et al.* 1985) wird der interne Cytosinrest der Sequenzmotive 5'-GCNGC-3' bzw. 5'-GGCC-3' geschützt. Infolge dessen wird eine Restriktion durch die Typ II Restriktionsendonuklease Cac824I vermieden. Für die Methylierung konstruierter

Vektoren wurden diese zunächst in *E. coli* ER2275 mit dem enthaltenden Vektor pAN1 transformiert. Das auf dem Vektor pAN1 befindliche Gen codiert für die Methyltransferase Φ 3TI des *B. subtilis* Phagen Φ 3T, so dass spezifische Sequenzmotive (5'-GCNGC-3') mit Schutzgruppen versehen werden und eine Restriktion der DNA verhindert wird. Anschließend erfolgte die Isolierung der Vektoren aus *E. coli* ER2275 (pAN1) und die Überprüfung der Methylierung mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Fnu*4HI (Daten nicht gezeigt). Die konstruierten und erfolgreich methylierten Vektoren standen nunmehr für die Elektroporation in *C. acetobutylicum* (s. 2.4.4.2) zur Verfügung.

3.1.2 Überprüfung der Transkription

Für die Überprüfung der Genexpression des *hydA* Gens in *sense*- bzw. *antisense*-Orientierung stellt die Northern-Blot Analyse (Alwine, Kemp *et al.* 1977) eine geeignete Methode dar. Ziel des Versuches war es, unter Verwendung von Digoxigenin-11-UTP (DIG) markierter RNA-Sonden die mRNA, wie auch der Antisense-RNA verschiedener *C. acetobutylicum* ATCC 824 Stämme zu detektieren.

3.1.2.1 Detektion der Antisense-RNA der Hydrogenase HydA

Für die Überprüfung der Expression des *hydA* Gens in Antisense Orientierung wurden drei verschieden lange DNA-Fragmente der Hydrogenase HydA in den Shuttle-Vektor pSOS95 kloniert. Die konstruierten Vektoren pDK1, pDK2, pDK3 sowie der mitgeführte Kontrollvektor pSOSzero (s. Abbildung 3.2 und 3.3) wurden nach ihrer Methylierung in *C. acetobutylicum* via Elektroporation transformiert. Für den Nachweis der Transkription stabiler Antisense-RNA in den Zellen der Stämme *C. acetobutylicum* pDK1, *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 wurden Northern-Blot Analysen durchgeführt (s. 2.5.8). Hierfür wurde die RNA aus den Zellen der logarithmischen Wachstumsphase verschiedener *C. acetobutylicum* Stämme (s. 2.5.4) isoliert. Nach der qualitativen Analyse via RT-PCR (s. 2.6.6) und denaturierender Gelelektrophorese (s. 2.5.6) erfolgte die Übertragung der RNA auf die positiv-geladene Nylon-Membran (s. 2.5.8.4). Für die Detektion der Antisense-RNA der Hydrogenase HydA wurde eine 500 bp lange DIG-markierten RNA-Sonde verwendet (s. Abbildung 3.4 B). Ausgehend vom Transkriptions-Startpunkt weist sie

komplementäre Sequenzen zur Antisense-RNA der Hydrogenase auf. Infolge der Northern-Blot Analyse erfolgte die spezifische Bindung der DIG-markierten RNA-Sonde an die Antisense-RNA des *ashydA30* Transkriptes in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3. Nach der enzymatischen Dephosphorylierung des Substrates CDP-Star durch die alkalische Phosphatase (AP) konnte das 529 bp lange Transkript im Transilluminator (GE Healthcare ImageQuant™ 400) dokumentiert werden (s. Abbildung 3.4 C). Darüber hinaus gelang es, die Transkription der Antisense-RNA des *ashydA60* Fragmentes in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 nachzuweisen. Die Bindung der DIG-markierten RNA-Sonde an das 1049 bp lange Transkript wurde ebenfalls infolge der enzymatischen Dephosphorylierung visualisiert (s. Abbildung 3.4 C). Des Weiteren wurde ferner die Transkription der Antisense-RNA des *ashydA94* Fragmentes im Stamm *C. acetobutylicum* pDK1 infolge der enzymatischen Reaktion bestätigt. Das 1649 bp lange Fragment konnte mit Hilfe des Transilluminator (GE Healthcare ImageQuant™ 400) dokumentiert werden (s. Abbildung 3.4 C). Die mitgeführten Kontrollstämme *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* pSOSzero transkribierten unterdessen ausschließlich die mRNA der Hydrogenase HydA (s. Abbildung 3.4 A). Da die DIG-markierte RNA-Sonde keine Komplementarität zur mRNA aufwies, konnten keine Transkripte in den Kontrollstämmen via Northern-Blot Analyse dokumentiert werden. Dadurch wurde die spezifische Bindung der RNA-Sonde an die Antisense-RNA der Hydrogenase HydA bestätigt.

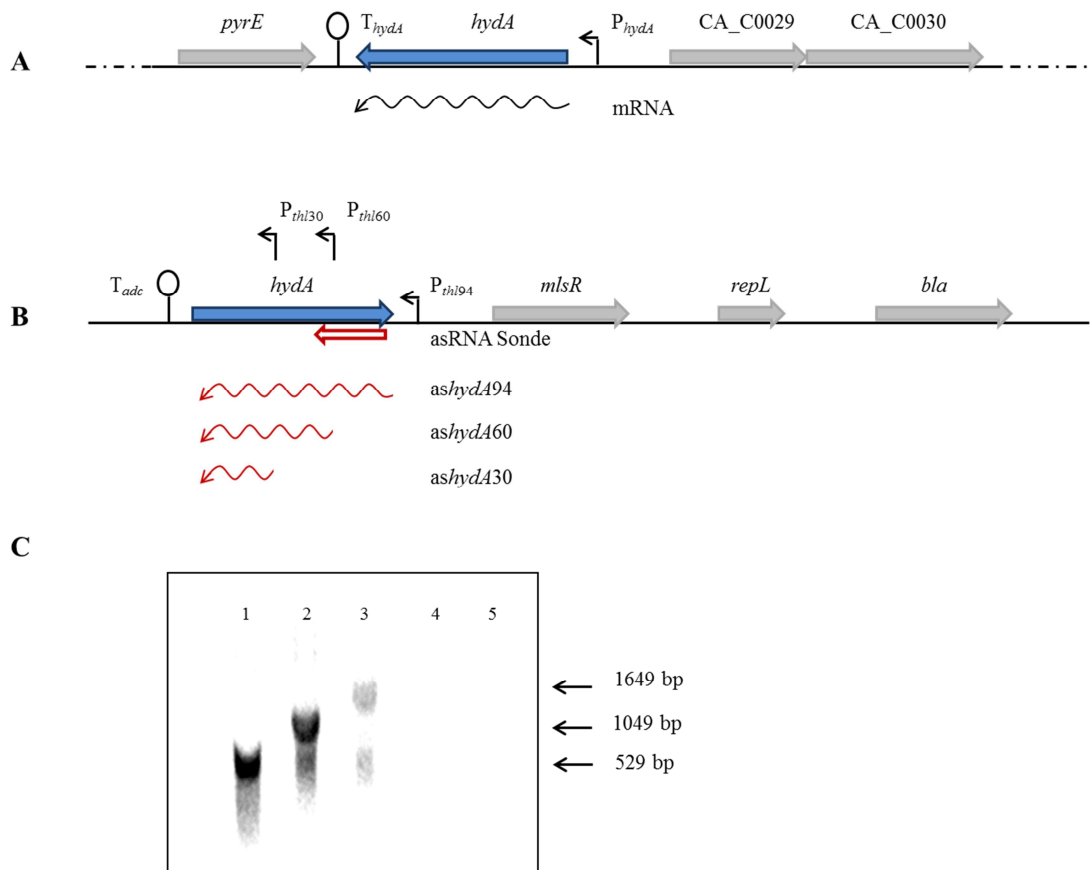


Abbildung 3.4: Detektion der Antisense-RNA der Hydrogenase HydA im Zuge der Northern-Blot Analyse **A:** chromosomale Orientierung des *hydA* Gens (blauer Pfeil) in *C. acetobutylicum* ATCC 824. Die transkribierte mRNA der Hydrogenase HydA wird durch einen gewellten schwarzen Pfeil symbolisiert. P_{hydA} und T_{hydA} : Promotor und Terminator des *hydA* Gens. **B:** Anordnung des *hydA* Gens in Antisense-Orientierung auf dem Shuttle-Vektor pSOS95 (blauer Pfeil). Mit Hilfe der Thiolase-Promotoren (P_{thi94} , P_{thi60} , P_{thi30}) und des Terminators der Acetoacetat-Decarboxylase (T_{adc}) entstanden verschieden lange Antisense-RNA Konstrukte der Hydrogenase HydA (gewellte rote Pfeile). Die Länge und Position der asRNA Sonde wird durch einen roten Pfeil unterhalb des Hydrogenase Gens markiert. Sie ist zu den verschieden langen asRNA Konstrukten der Hydrogenase komplementär. **C:** Northern-Blot Analyse verschiedener *C. acetobutylicum* ATCC 824 Stämme zur Detektion von asRNA Transkripten. *C. acetobutylicum* pDK3 (Spur 1), *C. acetobutylicum* pDK2 (Spur 2), *C. acetobutylicum* pDK1 (Spur 3), Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero (Spur 4) und Wildtyp *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Spur 5).

3.1.2.2 Detektion der mRNA der Hydrogenase HydA

Für die Detektion der infolge der Transkription entstandenen mRNA des Hydrogenase Gens wurde ebenfalls eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Mit Hilfe der Northern-Blot Analyse konnte indirekt auf die Doppelstrang-Bildung

zwischen mRNA und asRNA der Hydrogenase geschlossen werden. Hierfür wurde die RNA aus Zellen der logarithmischen Wachstumsphase der Kontrollstämmen wie auch der *C. acetobutylicum* ATCC 824 Stämme mit Antisense-RNA Konstrukten extrahiert (s. 2.5.4). Nach deren qualitativer Analyse via RT-PCR (s. 2.6.6) und denaturierenden Gelelektrophorese (s. 2.5.6) erfolgte die Northern-Blot Analyse mit Hilfe einer 500 bp langen DIG-markierten mRNA Sonde. Diese zeichnet sich durch eine Sequenzkomplementarität zu dem 5'-Ende der mRNA der Hydrogenase aus. Infolge der Transkription des chromosomal lokalisierten Hydrogenase Gens erfolgte die Synthese der mRNA (s. Abbildung 3.5 A). Aufgrund der Komplementarität zwischen mRNA und DIG-markierten mRNA Sonde konnte diese spezifisch binden und die Transkription des 1750 bp langen Transkripts in den Kontrollstämmen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* pSOSzero nachweisen (s. Abbildung 3.5 C). Indes transkribierten die *C. acetobutylicum* ATCC 824 Stämme mit den Antisense-RNA Konstrukten (s. Abbildung 3.2 A) neben der mRNA auch die verschieden langen Antisense-RNA Fragmente der Hydrogenase (s. Abbildung 3.5 B). Die Komplementarität zwischen mRNA und den verschieden langen asRNA Transkripten (*ashyA30*, *ashyA60*, *ashyA94*) zog eine Doppelstrang-Bildung nach sich, wodurch die RNA schneller abgebaut oder die spezifische Bindung der DIG-markierten mRNA-Sonde an die mRNA der Hydrogenase verhindert wurde (s. Abbildung 3.5 C). Folglich konnten mit Hilfe der enzymatischen Dephosphorylierung des Substrates CDP-Star durch die alkalische Phosphatase (AP) die Transkription der mRNA in den Kontrollstämmen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* pSOSzero nachgewiesen und die Doppelstrang-Bildung in den *C. acetobutylicum* ATCC 824 Stämmen mit Antisense-RNA Konstrukten bestätigt werden.

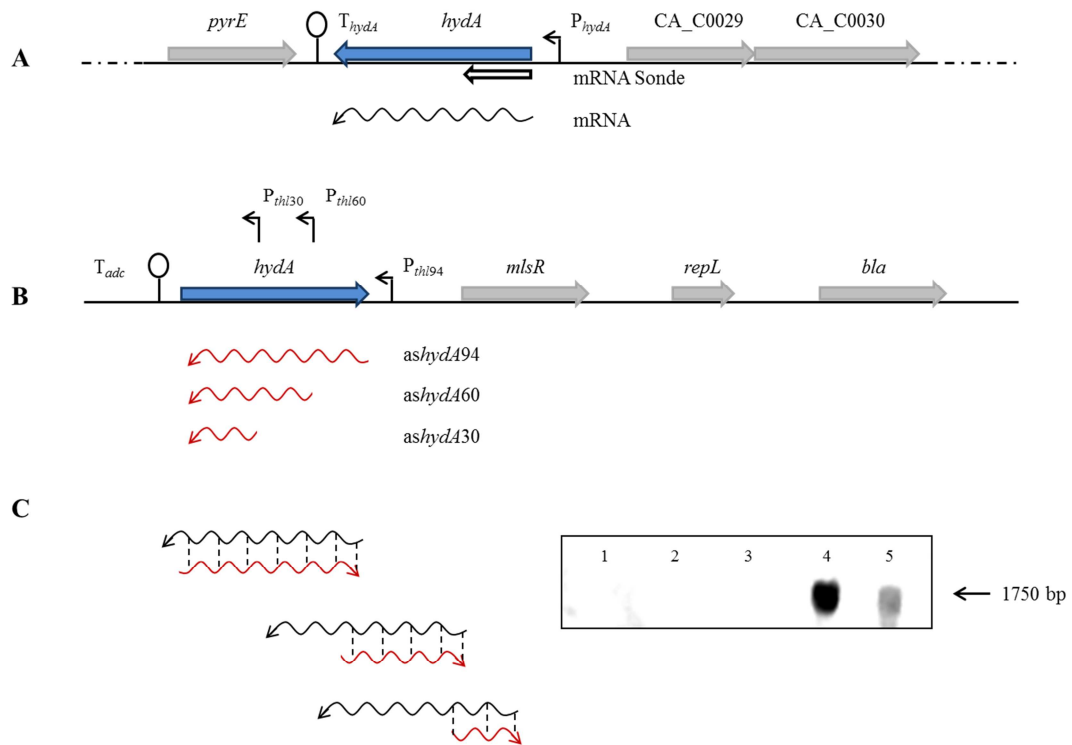


Abbildung 3.5: Detektion der mRNA der Hydrogenase HydA im Zuge der Northern-Blot Analyse **A:** chromosomale Orientierung des monocistronischen Operons der Hydrogenase HydA in *C. acetobutylicum* (blauer Pfeil). Die Transkription der mRNA des *hydA* Gens ist durch einen gewellten schwarzen Pfeil dargestellt. Die Position und Länge der mRNA Sonde wird durch einen dicken schwarzen Pfeil unterhalb des *hydA* Gens symbolisiert. P_{hydA} und T_{hydA} : Promotor und Terminator des *hydA* Gens. **B:** Die Anordnung des *hydA* Gens in Antisense-Orientierung auf dem Shuttle-Vektor pSOS95 wird durch einen blauen Pfeil dargestellt. Die Transkription verschieden langer Antisense-RNA Fragmente (*ashyda30*, *ashyda60*, *ashyda94*) wird mit Hilfe rot gewellter Pfeile symbolisiert. P_{thl94} , P_{thl60} , P_{thl30} : Thiolase Promotoren der verschiedenen langen Antisense-RNA Fragmente aus *C. acetobutylicum*; T_{adc} : Terminator der Acetoacetat-Decarboxylase aus *C. acetobutylicum*. **C:** Die Komplementarität und somit die Doppelstrang-Bildung zwischen mRNA (schwarz gewellter Pfeil) und asRNA (rot gewellter Pfeil) der Hydrogenase HydA ist mit Hilfe unterbrochener schwarzer Linien gekennzeichnet. *C. acetobutylicum* pDK3 (Spur 1), *C. acetobutylicum* pDK2 (Spur 2), *C. acetobutylicum* pDK1 (Spur 3). Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero (Spur 4) und Wildtyp *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Spur 5).

3.1.3 Quantitative Analyse der Hydrogenase HydA Aktivität

Mit dem Nachweis der Transkription von mRNA und asRNA der Hydrogenase HydA via Northern-Blot Analyse sollte überprüft werden, in wie weit die Hydrogenase-Aktivität in Abhängigkeit der Antisense-RNA Transkriptlänge beeinflusst werden würde. Für die biochemische Charakterisierung der Hydrogenase

Ergebnisse

HydA in den Kontrollstämmen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* pSOSzero wie auch in den Stämmen mit den Antisense-RNA Konstrukten dienten die Rohextrakte aus den Zellen der logarithmischen Wachstumsphase (s. 2.10.1). Die quantitative Analyse der Hydrogenase HydA Aktivität zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollstämmen und den *C. acetobutylicum* Stämmen mit Antisense-RNA Konstrukte auf (s. Tabelle 3.1).

Tab. 3.1: Vergleichende Darstellung der gemessenen Hydrogenase HydA Aktivitäten. Angegeben sind die Mittelwerte der Hydrogenase HydA Aktivität aus unabhängig biologischen Experimenten.

Stamm	transformierter Vektor	Eigenschaft	Hydrogenase HydA Aktivität (U/mg Protein)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	-	Kontrollstamm (WT)	5,15
<i>C. acetobutylicum</i> pDK1	pDK1	94 % asRNA des <i>hydA</i> Gens	4,13
<i>C. acetobutylicum</i> pDK2	pDK2	60 % asRNA des <i>hydA</i> Gens	2,44
<i>C. acetobutylicum</i> pDK3	pDK3	30 % asRNA des <i>hydA</i> Gens	2,99
<i>C. acetobutylicum</i> pSOSzero	pSOSzero	Kontrollstamm unter Clarithromycin	5,02

In den mitgeführten Kontrollstämmen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero konnten ähnliche Hydrogenase HydA Aktivitäten nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.6). Während der Wildtyp Stamm eine Hydrogenase HydA Aktivität von 5,15 U/mg Protein aufwies, verminderte sich diese unter Verwendung von Clarithromycin in dem Stamm *C. acetobutylicum* pSOSzero auf 5,02 U/mg Protein. Der Einfluss der Antisense-RNA Konstrukte auf die Hydrogenase HydA Aktivität konnte zweifelsfrei belegt werden. Jedoch nahm wider erwarten die Hydrogenase HydA Aktivität in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK1 geringfügig im Vergleich zu der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum*

pSOSzero ab. Die gemessene Hydrogenase HydA Aktivität in dem Stamm mit dem längsten Antisense-RNA Transkript fiel daher mit 4,13 U/mg Protein überraschend hoch aus. Im Gegensatz dazu konnte in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 eine deutlich verminderte Hydrogenase HydA Aktivität nachgewiesen werden. Mit einer Aktivität von 2,44 U/mg Protein zeigte das Antisense-RNA Transkript mit einer Länge von 60 % der mRNA den größten Effekt auf die Hydrogenase HydA Aktivität. Dem folgend konnte in *C. acetobutylicum* pDK3 lediglich eine Hydrogenase HydA Aktivität von 2,99 U/mg Protein nachgewiesen werden.

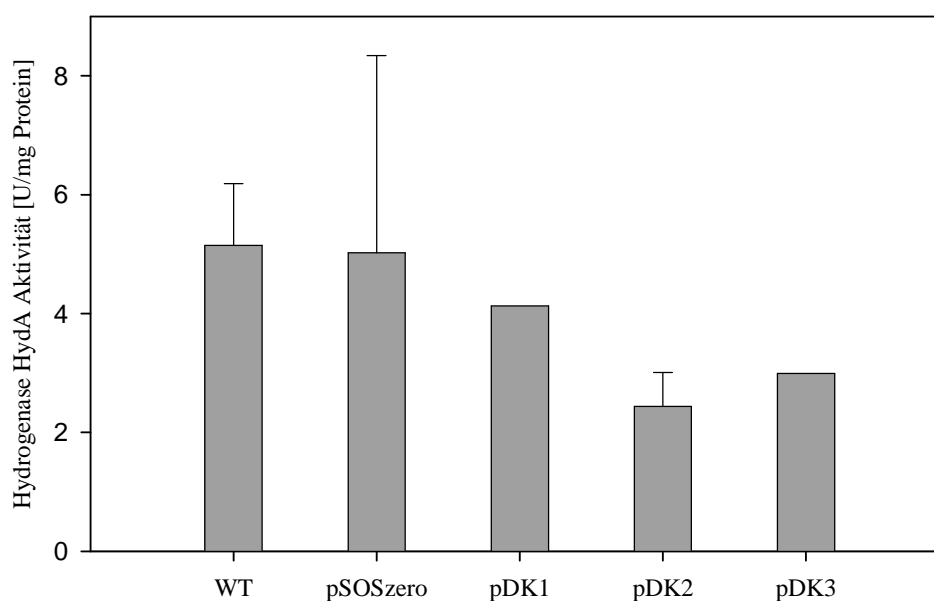


Abbildung 3.6: Einfluss der Antisense-RNA Konstrukte auf die Hydrogenase HydA Aktivität.

Die Anzucht der Stämme erfolgte in 200 ml CG-Medium (WT) bzw. CG-Medium mit Clarithromycin bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 2,0$). Die Aktivitätsmessung der Hydrogenase HydA wurde mit Proteinrohextrakten der einzelnen Stämme unter Verwendung von 50 mM KP-Puffer (pH 7,0; 15 mM DTT) und 0,5 M Benzylviologen im Spektrophotometer durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Hydrogenase HydA Aktivität aus mehreren unabhängigen biologischen Experimenten.

Diese biochemischen Daten deuteten auf eine signifikante Verminderung der Hydrogenase HydA Aktivität in Abhängigkeit verwendeter Antisense-RNA Konstrukte hin (s. Abbildung 3.6). Zudem warfen sie die Frage auf, ob infolge einer verminderten Hydrogenase HydA Aktivität die Produktion an H_2 beeinflusst werden würde. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden quantitative Analysen der

H₂-Produktion in den Kontrollstämmen wie auch in den *C. acetobutylicum* ATCC 824 Stämmen mit Antisense-RNA Konstrukten durchgeführt.

3.1.4 Quantitative Analyse der H₂-Produktion

Nachdem die biochemischen Untersuchungen eine signifikante Verminderung der Hydrogenase HydA Aktivität in Anwesenheit der Antisense-RNA Konstrukte bestätigten, galt es deren Einfluss auf die H₂-Produktion zu untersuchen. Für die quantitative Analyse der H₂-Produktion wurden sowohl die Kontrollstämme *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* ATCC pSOSzero als auch die Stämmen mit den Antisense-RNA Konstrukten, wie unter 2.9 beschrieben, näher untersucht. Hierbei konnten deutliche Unterschiede in der H₂-Produktion in Abhängigkeit der Antisense-RNA Transkriptlänge und der verminderten Hydrogenase HydA Aktivität aufgezeigt werden (s. Abbildung 3.7).

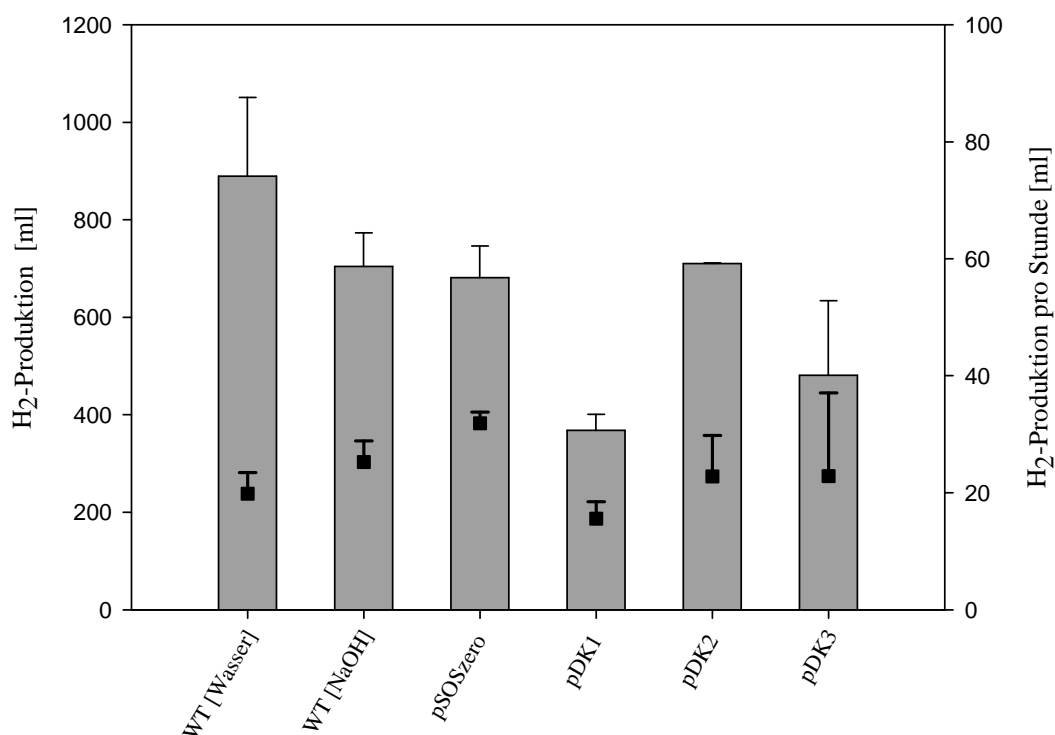


Abbildung 3.7: Einfluss der Antisense-RNA Konstrukte auf die H₂-Produktion und die H₂-Produktion pro Stunde. Dargestellt sind die gebildeten Mengen H₂ nach 27 h des Wachstums (Balken). Aus der Steigung der H₂-Produktion konnte die H₂-Produktion pro Stunde ermittelt werden (■). Als Messflüssigkeit wurde NaOH verwendet. WT: Wildtyp. Die H₂-Produktion wurde aus den Mittelwerten von zwei unabhängig biologischen Experimenten ermittelt.

Mit der Zellanzucht von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (WT) in Gegenwart der Messflüssigkeit Wasser kann die Gesamt-Menge der produzierten Gase (CO_2 , H_2) bestimmt werden. Durch die Verwendung von NaOH als Messflüssigkeit und der nahezu vollständigen Löslichkeit von CO_2 (s. Abbildung 3.8) konnte die absolute H_2 -Produktion analysiert werden. Als Vektor-Kontrolle diente der Stamm *C. acetobutylicum* pSOSzero. Unter Verwendung von Clarithromycin konnte eine geringe Verminderung der H_2 -Produktion im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden, wohingegen die H_2 -Produktion pro Stunde um den Faktor von 1,3 zunahm. *C. acetobutylicum* pDK1 zeigte den größten Effekt auf die H_2 -Produktion. Trotz einer geringen Verminderung der Hydrogenase HydA Aktivität (s. Abbildung 3.6) reduzierte sich die H_2 -Produktion und die H_2 -Produktion pro Stunde im Vergleich zu der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero um den Faktor 2. Indes war in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 ein gegenläufiger Effekt nachweisbar. Der Stamm mit der geringsten Hydrogenase HydA Aktivität schien die H_2 -Produktion nicht zu beeinflussen. Betrachtet man ungeachtet dessen die H_2 -Produktion pro Stunde, so ist auf eine Reduktion derselbigen um den Faktor 1,4 hinzuweisen. Folglich konnte eine Beeinträchtigung innerhalb der H_2 -Produktion durch eine verminderte Hydrogenase HydA Aktivität nachgewiesen werden. Ein ähnliches Verhalten war in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 zu beobachten. Die H_2 -Produktion wie auch die H_2 -Produktion pro Stunde reduzierten sich im Vergleich zu der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero um den Faktor 1,4. Diese biochemischen Daten deuteten auf eine signifikante Reduktion der H_2 -Produktion in Abhängigkeit verwendeter Antisense-RNA Konstrukte und damit verbundener Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität hin.

3.1.4.1 Absorption von Kohlendioxid

Mit der quantitativen Analyse der H_2 -Produktion drängte sich die Frage auf, in wie weit 0,1 M NaOH als Messflüssigkeit das Gärungsprodukt CO_2 aufnehmen kann. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden die verwendeten Messflüssigkeiten, wie unter 2.9 beschrieben, mit den Gasen H_2 und CO_2 durchströmt. Die quantitative Löslichkeit der verwendeten Gase bezogen auf die Messflüssigkeit unterschied sich deutlich voneinander. Während sich H_2 weder in 0,1 M NaOH noch in H_2O löste, war die Löslichkeit von CO_2 in beiden Messflüssigkeiten deutlich. In H_2O gelöstes

CO₂ bildet Kohlensäure (H₂CO₃), wohingegen die nahezu vollständige Löslichkeit von CO₂ in 0,1 M NaOH die Bildung von Natriumcarbonat (Na₂CO₃) und H₂O nach sich zieht. Die in Abbildung 3.8 gezeigten Löslichkeiten der verwendeten Gase in den Messflüssigkeiten lassen auf eine vollständige Löslichkeit von CO₂ in 0,1 M NaOH schließen. Auf diese Weise konnte die alleinige Detektion von H₂ während der quantitativen Analyse nachgewiesen werden (s. 3.1.4.).

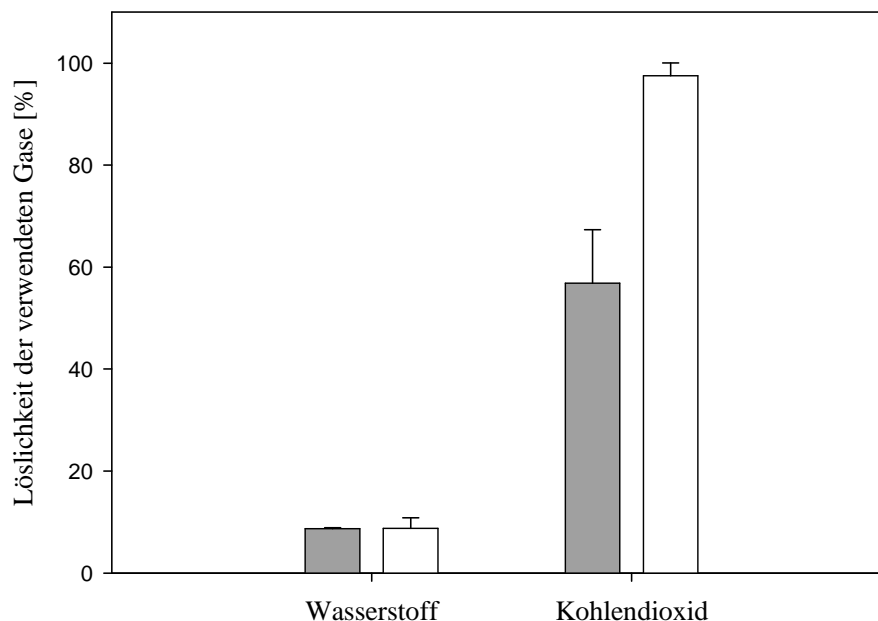


Abbildung 3.8: Löslichkeit der Gase H₂ bzw. CO₂ in den Referenzflüssigkeiten 0,1 M NaOH (weiße Balken) und Wasser (graue Balken). Die mit den Referenzflüssigkeiten enthaltenen Glaszylinder wurden mit definierten Volumen CO₂ und H₂ begast und die verdrängten Volumen an Flüssigkeiten dokumentiert. Die Löslichkeit der Gase wurde aus unabhängigen Experimenten ermittelt.

3.1.5 Untersuchung der Fermentationsprodukte

Für die Quantifizierung der Fermentationsprodukte wurden die Kontrollstämme *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* pSOSzero sowie die Stämme mit den enthaltenen Antisense-RNA Konstrukten in CG-Medium mit gegebenenfalls Clarithromycin angezogen und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte ($\lambda = 600$ nm) und der pH-Wert gemessen. Dabei konnten keine Veränderungen des Wachstums in Abhängigkeit der Verwendung von Antisense-RNA Konstrukten und der damit verbundenen Reduzierung der Hydrogenase HydA Aktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus galt es, den Einfluss einer

verminderten Hydrogenase HydA Aktivität auf die Quantifizierung der Fermentationsprodukte zu untersuchen. Hierfür wurden nach 32 h Wachstum Proben entnommen und die Kulturüberstände, wie in 2.8.1 beschrieben, analysiert.

Als Hauptfermentationsprodukte konnten die acidogenen Fermentationsprodukte Acetat und Butyrat sowie die solventogenen Lösungsmittel Ethanol, Aceton und Butanol identifiziert werden. Die quantitative Analyse der Fermentationsprodukte zeigte deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität auf (s. Abbildung 3.9).

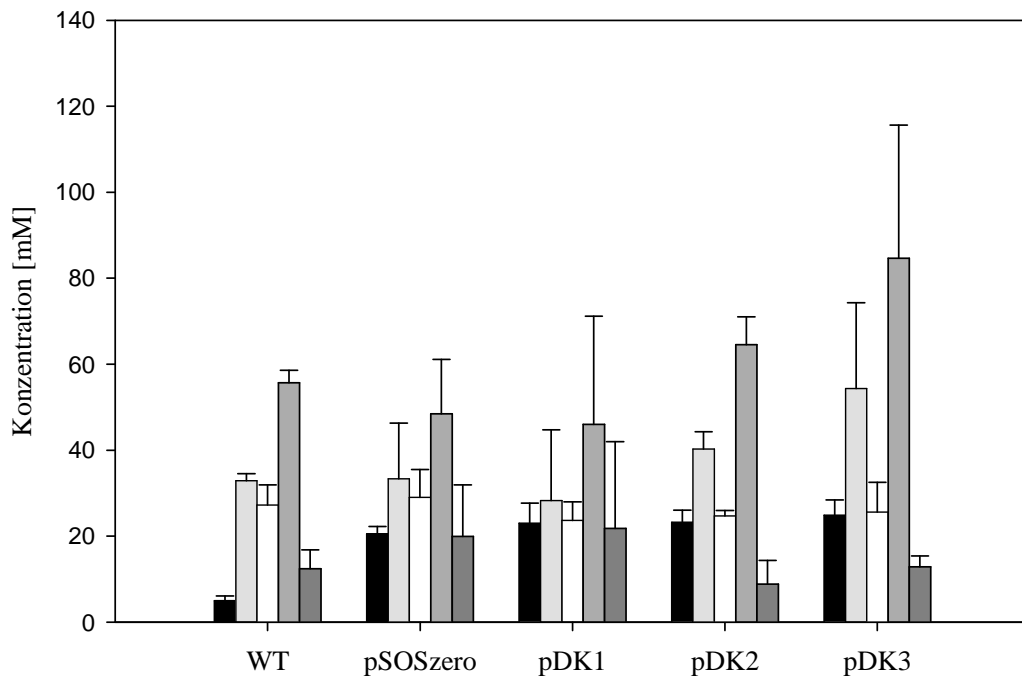


Abbildung 3.9: Quantitative Analyse der Fermentationsprodukte nach 32 h Wachstum. Dargestellt sind die Kontrollstämme *C. acetobutylicum* ATCC 824 (ohne Clarithromycin) und *C. acetobutylicum* pSOSzero sowie die Stämme mit den Antisense-RNA Konstrukten (pDK1, pDK2, pDK3) in Gegenwart von Clarithromycin. Die Konzentration der Fermentationsprodukte Ethanol (schwarz), Aceton (hellgrau), Acetat (weiß), Butanol (mittelgrau) und Butyrat (dunkelgrau) wurden aus drei unabhängig biologischen Experimenten ermittelt.

Die mitgeführten Kontrollstämme *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* pSOSzero unterschieden sich in der Menge einzelner Fermentationsprodukte voneinander. Während *C. acetobutylicum* pSOSzero in Gegenwart von Clarithromycin eine um den Faktor 4 höhere Ethanol-Produktion aufwies, nahm die Butanol-Produktion im Vergleich zum Wildtyp-Stamm ab. Im

Gegenzug dazu konnte eine leicht erhöhte Butyrat-Konzentration nachgewiesen werden. Anhand dieser Kontrolle konnte der Einfluss des Antibiotikums Clarithromycin auf die Menge der Fermentationsprodukte verdeutlicht werden, wodurch die folgenden Erläuterungen in Bezug auf die Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero zu sehen sind. Die Verwendung der Antisense-RNA Konstrukte und die damit verbundene Reduzierung der Hydrogenase HydA Aktivität beeinflusste die Menge der Fermentationsprodukte deutlich. Während in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK1 kaum Veränderungen hinsichtlich acidogener und solventogener Fermentationsprodukte zu beobachten waren, lösten die Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 mit den geringsten nachgewiesenen Hydrogenase HydA Aktivitäten den deutlichsten Effekt auf die Fermentationsprodukte aus. Unter dem Gesichtspunkt, dass bei Eintritt in die Solventogenese anhäufte Säuren in hohen Konzentrationen durch die Aktivität der Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat CoA Transferase (CoA-Transferase; CtfA, CtfB) in Acetyl-CoA und vermehrt Butyryl-CoA umgesetzt werden (Rogers, 1986), war mit einer Abnahme der Butyrat/Acetat- und einer Zunahme der Butanol/Ethanol/Aceton-Konzentration zu rechnen (Tomas, Welker *et al.* 2003). Dieser Effekt scheint infolge der Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität verstärkt zu werden. So stieg die Ethanol-Konzentration in *C. acetobutylicum* pDK2 im gleichen Verhältnis zur Abnahme der Acetat-Konzentration (ca. 14 %). Indes konnte ein stärkerer Einfluss der reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität auf die Butanol-Produktion beobachtet werden. Während die Butyrat-Konzentration um 56 % abnahm, stieg infolgedessen die Butanol-Konzentration um etwa 33 %. Darüber hinaus wurde mit der Reabsorption der Säuren die Aceton-Produktion begünstigt (21 %ige Steigerung). Der Einfluss einer reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität mit resultierender verminderter H₂-Produktion auf die Menge der Fermentationsprodukte konnte anhand von *C. acetobutylicum* pDK3 verstärkt untermauert werden. Infolge der Verminderung der Acetat- bzw. Butyrat-Konzentration durch die Aktivität der CoA-Transferase steigerten sich die Ethanol- (um 21 %) und vor allem die Butanol-Konzentrationen (um 75 %) auf ein Maximum. Gleichzeitig konnte die höchste Konzentration an Aceton (63 %ige Steigerung) mit Hilfe der Gas-Chromatographie (s. 2.8.1) detektiert werden.

Diese biochemischen Daten legen den Schluss nahe, dass infolge der Reduzierung der Hydrogenase HydA Aktivität die Produktion der solventogenen Lösungsmittel

wie Ethanol, Aceton und Butanol signifikant erhöht wird. Die Hydrogenase HydA nimmt folglich eine zentrale Rolle in der Regulation des Elektronenflusses während der Solventogenese ein. Die aus physiologischer Sicht veränderte Menge der Fermentationsprodukte wird im weiteren Verlauf auf transkriptioneller Ebene mittels DNA-Microarrays untersucht.

3.1.6 Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3

Für die Untersuchung der Transkription von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero dienten Oligo-basierende DNA-Microarrays. Um eine vergleichende Genexpression der Stämme zu gewährleisten, wurden diese unter identischen Wachstumsbedingungen angezogen und innerhalb der gleichen Wachstumsphase geerntet. Die Expressionsdaten der logarithmischen bzw. stationären Phase der Stämme basieren auf je zwei unabhängig biologischen Experimenten und vier Hybridisierungsreaktionen. Es sei darauf hinzuweisen, dass es sich bei den Expressionsdaten um keine absoluten Werte handelt. Für eine übersichtliche Darstellung wurden die Expressionsdaten logarithmisch zur Basis 2 dargestellt, wobei eine Transkriptionsänderung um den Faktor 3 einem Wert von 1,5849 bzw. -1,5849 entspricht.

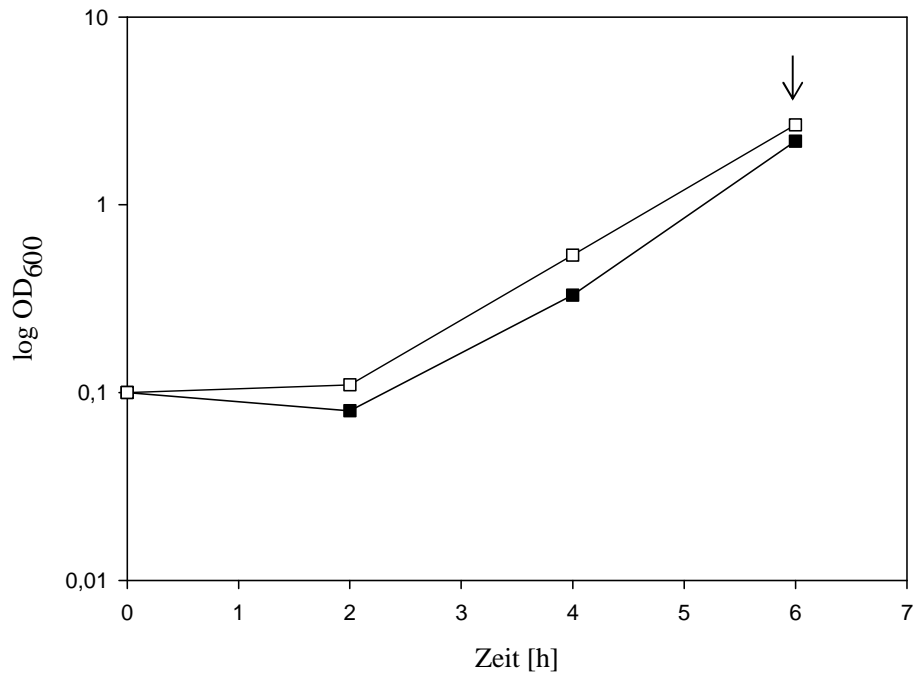
3.1.6.1 Genexpressionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero bei logarithmischem Wachstum

Um die biochemischen Daten in den vorherigen Abschnitten auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden die Zellen von *C. acetobutylicum* pDK2, *C. acetobutylicum* pDK3 und der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero in je 100 ml CG-Medium mit Clarithromycin unter stetiger Kontrolle der optische Dichte ($\lambda = 600$ nm) und des pH-Wertes angezogen. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD = 1,4-2,6) erfolgte die Zellernte der Batch-Kulturen *C. acetobutylicum* pDK2 (s. Abbildung 3.10 A), *C. acetobutylicum* pDK3 (s. Abbildung 3.10 B) und *C. acetobutylicum* pSOSzero (s. Abbildung 3.10 A/B).

Ergebnisse

Die RNA wurde, wie unter 2.5.2 beschrieben, isoliert und die Transkription mittels DNA-Microarray verfolgt.

A



B

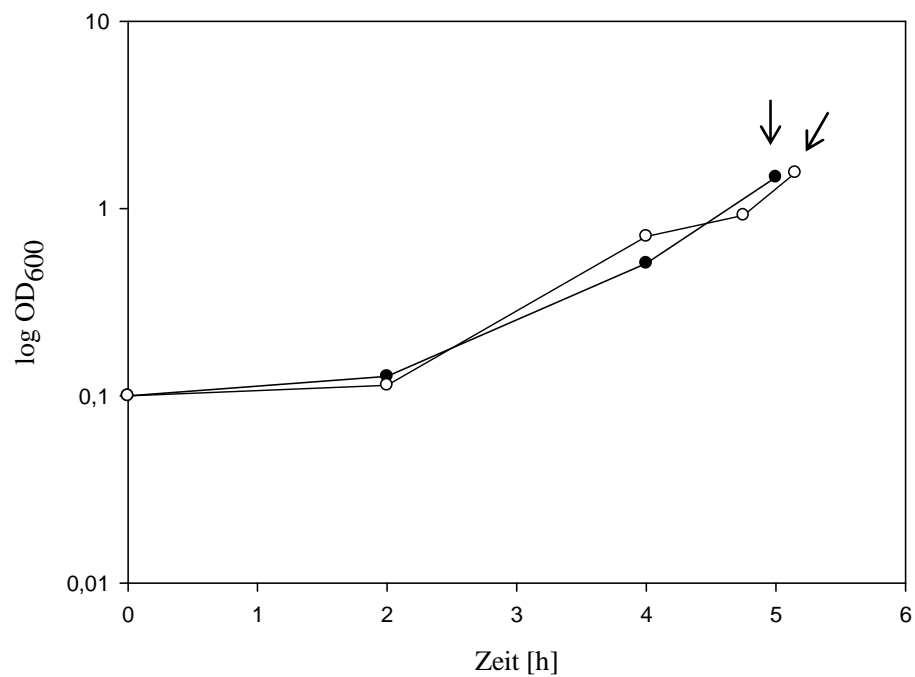


Abbildung 3.10: Wachstumskurven für die Transkriptionsanalysen bei logarithmischem Wachstum. A: Wachstum der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 (■) und *C. acetobutylicum* pSOSzero (□). **B:** Wachstum der Stämme *C. acetobutylicum* pDK3 (●) und *C. acetobutylicum* pSOSzero (○). Die Kulturen wurden je in 100 ml CG-Medium unter Verwendung von Clarithromycin angezogen. Der Zeitpunkt der Zellernte der Stämme ist mit Hilfe eines Pfeils gekennzeichnet.

Mit den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 während des logarithmischen Wachstums drängte sich die Frage auf, welchen Einfluss die Antisense-RNA Konstruktlänge und daraus resultierend die verminderte Hydrogenase HydA Aktivität auf das Expressionsverhalten der Stämme ausübt.

Expression der Gene des fermentativen Stoffwechsels

Ein Hauptaugenmerk dieser Transkriptionsanalysen richtete sich auf den fermentativen Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Die Transkriptionsdaten beider Stämme wurden für eine übersichtlichere Darstellung in zwei Graphiken zusammengestellt (s. Abbildung 3.11 und 3.12). Dabei zeigten sich in Abhängigkeit der Antisense-RNA Konstruktlänge und der reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität signifikante Unterschiede hinsichtlich der Expression von Genen der Acido- und Solventogenese. Die Expressionsdaten und Annotationen der Gene sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

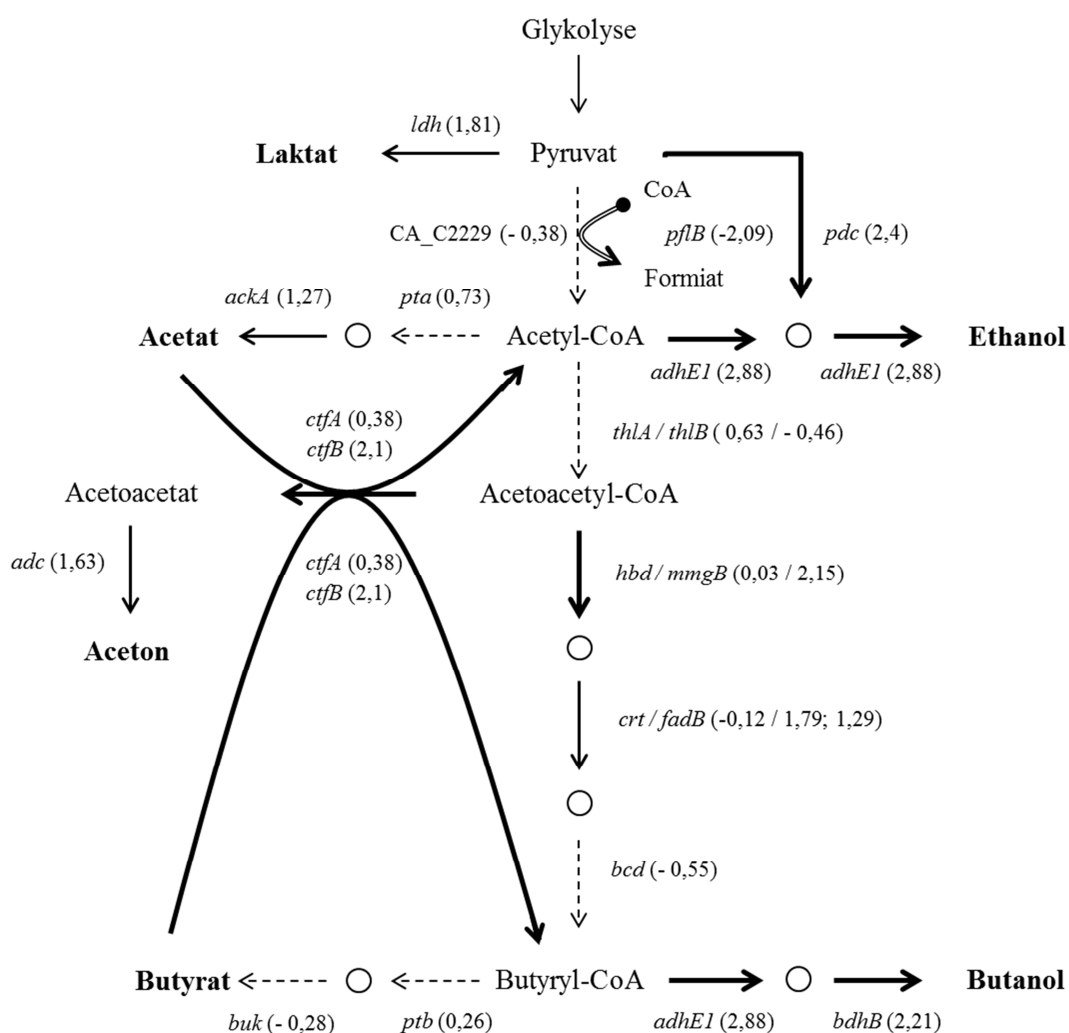


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des fermentativen Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* pDK2 während des logarithmischen Wachstums. Die Expressionsdaten geben das Expressionsverhältnis der Gene von *C. acetobutylicum* pDK2 und der Vektorkontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero wieder. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkte Genexpression in dem Stamm *C. acetobutylicum* ATCC pDK2 (\longrightarrow). Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Genexpression in Vektorkontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero ($\bullet\longrightarrow$) hin. Gene, welche in beiden Stämmen keine Expressionsänderungen aufzeigten, sind durch einen gestrichelten Pfeil gekennzeichnet ($- \longrightarrow$). Die Stärke der Reaktionspfeile symbolisiert die Expressionsstärke des Gens. Zwischenprodukte im Stoffwechsel (○). Es handelt sich um eine logarithmische Darstellung der Expressionsdaten und repräsentative Einzelmessungen.

Vergleichend zu Abbildung 3.11 sind die Transkriptionsdaten von *C. acetobutylicum* pDK3 während des logarithmischen Wachstums zu sehen (s. Abbildung 3.12).

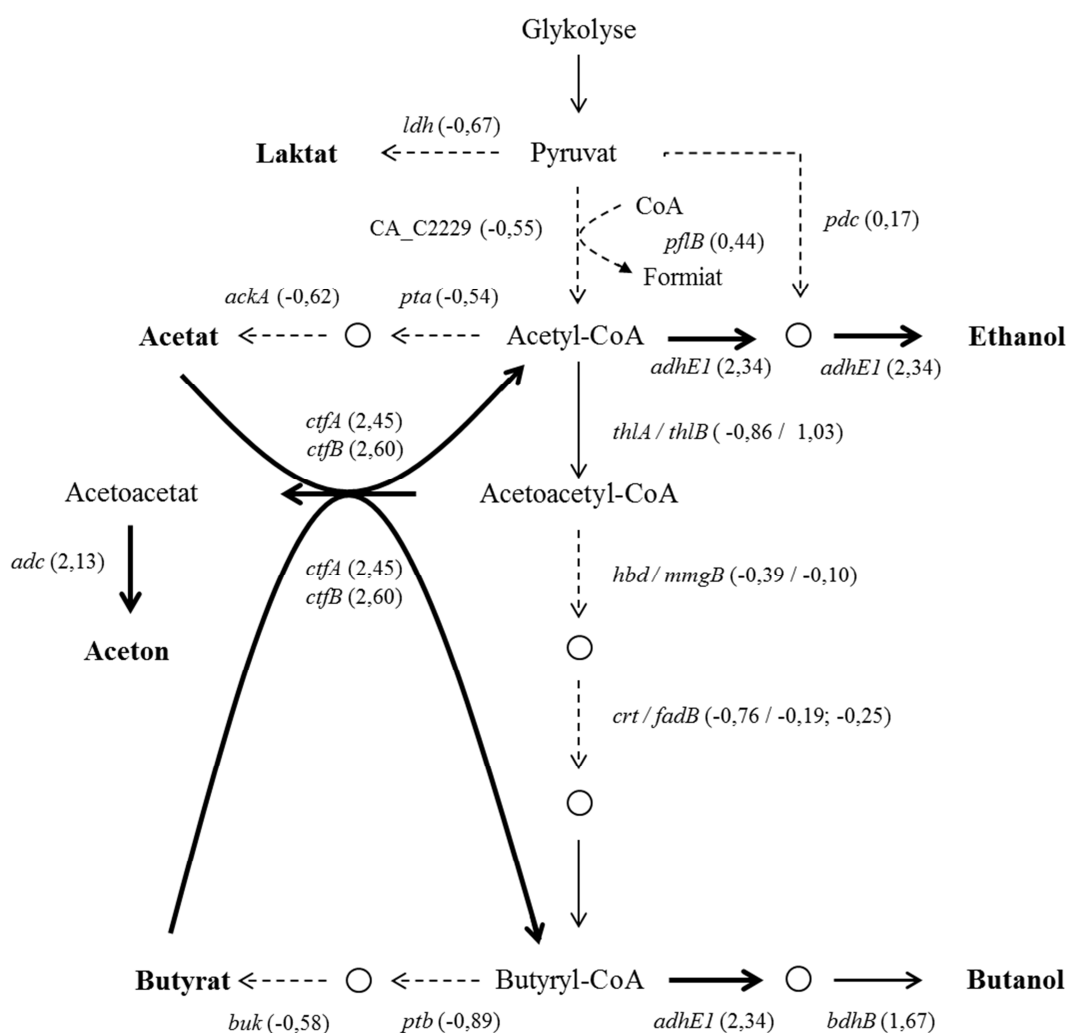


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des fermentativen Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* pDK3 während des logarithmischen Wachstums. Die Expressionsdaten geben das Expressionsverhältnis der Gene von *C. acetobutylicum* pDK3 und der Vektorkontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero wieder. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkte Genexpression in dem Stamm *C. acetobutylicum* ATCC pDK3 (\longrightarrow). Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Genexpression in Vektorkontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero ($\bullet\longrightarrow$) hin. Gene, welche in beiden Stämmen keine Expressionsänderungen aufzeigten, sind durch einen gestrichelten Pfeil gekennzeichnet ($- \longrightarrow$). Die Stärke der Reaktionspfeile symbolisiert die Expressionsstärke des Gens. Zwischenprodukte im Stoffwechsel (o). Es handelt sich um eine logarithmische Darstellung der Expressionsdaten und repräsentative Einzelmessungen.

Die in Abbildung 3.11 und 3.12 dargestellten Expressionsdaten zeigten signifikante Änderungen im Expressionsverhältnis einzelner an der Acido- bzw. Solventogenese beteiligter Gene auf. Im Rahmen des fermentativen Stoffwechsels konnten drei Gene der Oxidation von Pyruvat mit veränderter Transkriptionsstärke identifiziert werden. Für das Gen der Pyruvat-Decarboxylase (*pdh*) konnte eine signifikant verstärkte

Expression in *C. acetobutylicum* pDK2 nachgewiesen werden, während es in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 keine Expressionsänderung aufzeigte. Dem gegenüber stand das Gen der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (CA_C2229), dessen Expressionsverhältnis sich in beiden Stämmen nicht änderte. Untersuchungen in *E. coli* ergaben, dass die Bildung des Radikalenzym Pyruvat-Formiat-Lyase an ein Aktivierungsenzym gekoppelt ist (Knappe, Neugebauer *et al.* 1984; Wagner, Frey *et al.* 1992). In der Genomsequenz von *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnten die ORF's der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*) und ihres Aktivierungsenzyms (*pflA*) identifiziert werden. Die Gene *pflA* und *pflB*, welche an der Oxidation von Pyruvat zu Formiat und Acetyl-CoA beteiligt sind, zeigten eine verstärkte Induktion in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero.

Die an der Acetat- (*pta*) und Butyratbildung (*ptb*, *buk*) beteiligten Gene wiesen in beiden Stämmen keine Veränderungen seitens der Expressionsverhältnisse auf. Das Gen der Acetat-Kinase (*ackA*) stellte dabei eine Ausnahme dar. Es zeigte in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 im Vergleich zu *C. acetobutylicum* pDK3 eine zweifach höhere Expression.

Im Rahmen der Genomsequenzierung konnten zwei Sets von chromosomal lokalisierten Genen, welche an der Umsetzung von Acetoacetyl-CoA zu Crotonyl-CoA beteiligt sind, identifiziert werden (Nölling, Breton *et al.* 2001). Sie werden durch die kodierenden Gene der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*hbd*, *mmgB*) und der Enoyl-CoA Hydratase (*crt*, CA_C2012, CA_C2016) vertreten. Die Abbildung 3.11 zeigt Unterschiede hinsichtlich der Expression in einem dieser Sets (*mmgB*, CA_C2012) auf. Während die Expression von *mmgB* und *fadB* (CA_C2012) in *C. acetobutylicum* pDK2 signifikant verstärkt vorlag, konnten für beide Gene in *C. acetobutylicum* pDK3 keine Expressionsänderung nachgewiesen werden.

Anhand der Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnten zwei paraloge Gene der Thiolase (*thlA*, *thlB*) identifiziert werden. In den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 konnten unterschiedliche Expressionsverhalten beider Gene nachgewiesen werden. Während für *thlA* in beiden Stämmen keine Änderungen hinsichtlich der Expression beobachtet werden konnte, zeigte *thlB* eine erhöhte Transkription in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3.

Für die kodierenden Gene des Butyryl-CoA-Dehydrogenase-EtfA/B-Komplexes konnten ebenfalls unterschiedliche Transkriptionsdaten in den Stämmen

C. acetobutylicum pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 beobachtet werden. Während für *bcd* und *etfB* in beiden Stämmen keine Änderungen seitens der Expression ermittelt werden konnten, zeigte *etfA* eine signifikant verstärkte Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2.

Die Bildung der Lösungsmittel Aceton, Butanol Ethanol ist in *C. acetobutylicum* an die Reabsorption der produzierten Säuren Acetat und Butyrat gebunden. In *C. acetobutylicum* pDK3 zeigten beide an der Reabsorption beteiligten Gene (*ctfA/B*) eine signifikant verstärkte Expression, wenngleich in *C. acetobutylicum* pDK2 lediglich eine erhöhte Transkription von *ctfB* ermittelt werden konnte. Des Weiteren konnte für das Gen der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) eine deutlich höhere Expression in *C. acetobutylicum* pDK3 im Vergleich zu dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die kodierenden Gene der Butanol- und Ethanol-Produktion (*bdhB*, *adhE1*) ein gleichstark signifikantes Expressionsverhalten.

Neben der Produktion von Aceton, Butanol und Ethanol ist *C. acetobutylicum* in der Lage mit Laktat ein weiteres reduziertes Endprodukt zu bilden. Die L-Laktat-Dehydrogenase (*ldh*) zeigte in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 ein unterschiedliches Transkriptionsverhalten. Während *ldh* in *C. acetobutylicum* pDK3 nicht reguliert war, konnte für das Gen in *C. acetobutylicum* pDK2 eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Eine Übersicht aller dargelegten Gene mit deren Annotationen und Expressionen ist in der Tabelle 3.2 dargestellt.

Ergebnisse

Tab. 3.2: Expressionsverhältnisse von Genen des fermentativen Stoffwechsels in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei logarithmischem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C3299	<i>bdhA</i>	Butanol- Dehydrogenase A	0,80	-0,54
CA_C3298	<i>bdhB</i>	Butanol- Dehydrogenase B	2,21	1,69
CA_C3076	<i>ptb</i>	Phosphat-Butyryl- transferase	0,26	-0,89
CA_C3075	<i>buk</i>	Butyrat-Kinase	-0,28	-0,58
CA_C2873	<i>thlA</i>	Acetyl-CoA Acetyltransferase	0,63	-0,86
CA_C2712	<i>crt</i>	Enoyl-CoA Hydratase	-0,12	-0,67
CA_C2711	<i>bcd</i>	Butyryl-CoA- Dehydrogenase	-0,55	n.b.
CA_C2710	<i>etfB</i>	Elektronen-Transfer Flavoprotein B-Untereinheit	0,54	-0,91
CA_C2709	<i>etfA</i>	Elektronen-Transfer Flavoprotein A-Untereinheit	-2,18	-0,73
CA_C2708	<i>hbd</i>	3-Hydroxybutyryl- CoA- Dehydrogenase	0,03	-0,39
CA_C2499		Pyruvat-Ferredoxin- Oxidoreduktase	n.b.	n.b.
CA_C2229		Pyruvat-Ferredoxin- Oxidoreduktase	-0,38	-0,55

Ergebnisse

CA_C2016	<i>fadB</i>	Enoyl-CoA Hydratase	1,29	-0,25
CA_C2012	<i>fadB</i>	Enoyl-CoA Hydratase	1,79	-0,19
CA_C2009	<i>mmgB</i>	3-Hydroxybutyryl- CoA- Dehydrogenase	2,15	-0,09
CA_C1743	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase	1,27	-0,62
CA_C1742	<i>pta</i>	Phosphat- Acetyltransferase	0,73	-0,54
CA_C0981	<i>pflA</i>	Pyruvat-Formiat- Lyase aktivierendes Enzym	-1,84	0,51
CA_C0980	<i>pflB</i>	Pyruvat-Formiat- Lyase	-2,09	0,44
CA_C0267	<i>ldh</i>	L-Laktat- Dehydrogenase	1,81	-0,67
CA_P0165	<i>adc</i>	Acetoacetat- Decarboxylase	1,63	2,13
CA_P0164	<i>ctfB</i>	Butyrat-Acetoacetat- CoA-Transferase (Untereinheit B)	2,10	2,60
CA_P0163	<i>ctfA</i>	Butyrat-Acetoacetat- CoA-Transferase (Untereinheit A)	0,38	2,45
CA_P0162	<i>adhE1</i>	Aldehyd- Dehydrogenase	2,88	2,34
CA_P0078	<i>thlB</i>	Acetyl-CoA Acetyltransferase	-0,46	1,03
CA_P0035	<i>adhE2</i>	Aldehyd-Alkohol- Dehydrogenase	0,16	-0,20
CA_P0025	<i>pdc</i>	Pyruvat- Decarboxylase	2,4	0,17

Expression von Genen verschiedener Transportsysteme

Die Zuckerverwertung in *C. acetobutylicum* ist an verschiedene Transportsysteme der Zelle gebunden (Nölling, Breton *et al.* 2001). Das Phosphotransferase-System (PTS) stellt den Haupttransport-Mechanismus für Kohlenhydrat-Substrate in solventogenen Bakterien dar und ist gleichzeitig eines der wichtigsten regulatorischen Systeme der Zelle (z.B. für Kohlenstoff-Kataboliten-Repression CCR). Mit Hilfe bioinformatischer Analysen gelang es, 13 putative PTS Enzym II Systeme nachzuweisen (Nölling, Breton *et al.* 2001) (Mitchell & Tangney, 2005). Eines dieser identifizierten Phosphotransferase-Systeme ist das Fruktose-PTS (s. Abbildung 3.13), dessen Gene von einem Operon (CA_C0231-CA_C0234) kodiert werden (Servinsky, Kiel *et al.* 2010).

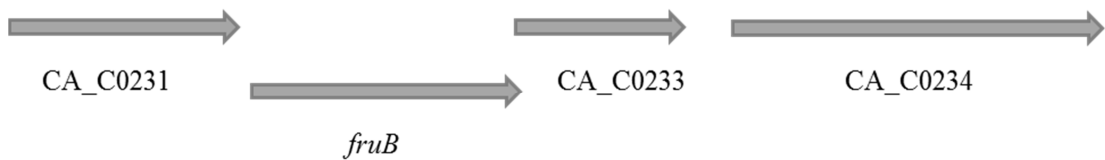


Abbildung 3.13: Chromosomale Anordnung des Fruktose-Operon. Erläuterung siehe Text.

In dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 zeigten die Gene des DeoR-ähnlichen Transkriptionsregulators (CA_C0231) und der 1-Phosphofruktokinase (CA_C0232) eine signifikant verstärkte Expression. Die Genexpressionen der *downstream* lokalisierten PTS EnzymIIA- (CA_C0233) und PTS EnzymIIBC-Komponenten (CA_C0234) verminderten sich jedoch um ein Vielfaches und wiesen keine Expressionsänderungen unter gewählten Bedingungen auf.

Ein weiteres Substrat-spezifisches Transportsystem ist das Laktose-PTS. Es wird von zwei Transkriptionseinheiten (CA_C2964-CA_C2963; CA_C2966-CA_C2965) kodiert und verfügt neben der 6-Phospho- β -D-Galaktosidase und eines DeoR-ähnlichen Transkriptionsregulators über zwei Enzym II (EII) Komponenten. Während *lacE* (CA_C2964) und *lacR* (CA_C2966) eine verstärkte Transkription dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 aufzeigten, konnten Veränderungen hinsichtlich der Expression bei den Genen *lacG* (CA_C2963) und *lacF* (CA_C2965) nicht detektiert werden.

Neben dem Vorhandensein verschiedener Zucker-spezifischer Phosphotransferase-Systeme, verfügt die Zelle über weitere Nichtphosphorylierungs-abhängige

Transportsysteme. Ein putativer Xylulose:Protonensymporter zeigte eine verstärkte Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2.

Für die Gene des Fruktose- (CA_C0231-CA_C0234) und Laktose-PTS (CA_C2964-CA_C2963; CA_C2966-CA_C2965) sowie für den putativer Xylulose:Protonensymporter konnten in *C. acetobutylicum* pDK3 keine erhöhten Expressionen nachgewiesen werden (s. Anhang Tabelle 7.6).

Die ABC-Transporter stellen eine weitere Möglichkeit dar unter ATP-Verbrauch einzelne Zucker und Ionen in die Zellen zu überführen. Anhand der Genomanalyse von *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnte ein Zucker ABC-Transportsystem, dessen Gene in einem Operon (CA_C0662-CA_C0667) organisiert sind, identifiziert werden. Die Expressionsdaten dieser Gene zeigten deutliche Unterschiede auf. Während die Gene CA_C0662, CA_C0663, CA_C0666 und CA_C0667 eine erhöhte Transkription in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 aufwiesen, konnten für CA_C0664-CA_C0665 keine Expressionsänderungen nachgewiesen werden.

Neben dem Zucker-Transport wird gleichermaßen der Transport von Ionen durch ABC-Transporter in die Zelle gewährleistet. In dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 zeigten die Gene eines Kalium ABC-Transporters (CA_C3680-CA_C3682) und jene eines Natrium ABC-Transportsystem (CA_C3550-CA_C3551) eine erhöhte Induktion. Gleiches konnte für ein Operon eines ABC-Transporters, dessen Verantwortung in der Aufnahme von Phosphat liegt, beobachtet werden (s. Abbildung 3.14).

In den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 zeigten jene Gene keine erhöhten Expressionen.



Abbildung 3.14: Schematische Darstellung eines putativen Operons zur Phosphat-Aufnahme in *C. acetobutylicum*.

Die Expressionsdaten und Funktionen der einzelnen Transportsysteme sind der Tabelle 7.6 im Anhang zu entnehmen.

Expression von Genen des *Quorum sensing* und der Sporulation

Quorum sensing ist ein Mechanismus, bei dem bakterielle Populationen die Genexpression als Antwort auf die Zelldichte koordiniert kontrollieren (Fuqua, Winans *et al.* 1994). In *Staphylococcus aureus* konnte ein *agr Quorum sensing* System identifiziert werden, das die globale Regulation einer Reihe von Virulenzgenen vermittelt (Novick 2003). Anhand von Sequenzvergleichen verschiedener Clostridien Stämme via BLAST auf Aminosäureebene ließen sich Homologien in *C. acetobutylicum* ATCC 824 zum *agr* Locus in *Staphylococcus aureus* identifizieren (Cooksley, Davis *et al.* 2010). Die ORF`s eines Genregulator-Proteins (*agrB*) und eines *Autoinducer* Peptids (*agrD*) sind *upstream* von den Genen einer Histidin-Sensor Kinase (*agrC*) und eines *Response*-Regulators (*agrA*) lokalisiert (s. Abbildung 3.15).

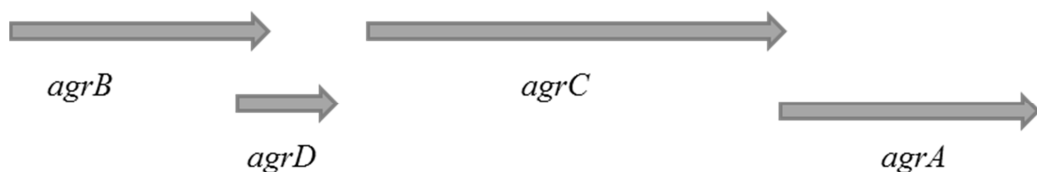


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des *agr* Locus in *C. acetobutylicum*. Erläuterung siehe Text.

In dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 konnte sowohl für das Gen eines Regulator-Proteins (*agrB*) als auch für das eines *Autoinducer* Peptids (*agrD*) eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Ein ähnliches Expressionsniveau wäre für die Gene der Histidin-Sensor Kinase (*agrC*) und des *Response*-Regulators (*agrA*) zu erwarten, doch tatsächlich konnten keine Veränderungen seitens der Expressionen dieser Gene ermittelt werden.

Während die Rolle des *Quorum sensing* in der Initiation der Sporulation in *Bacillus subtilis* gut untersucht ist (Pottathil and Lazazzera 2003), scheint die Zelldichte allein nicht ausreichend für Aktivierung dieses Prozesses zu sein. In *Clostridium sporogenes* und *Clostridium botulinum* konnte hingegen gezeigt werden, dass das *agrBD*-abhängige *Quorum sensing* System und demzufolge die Zelldichte eine entscheidende Rolle zu Beginn der Sporulation spielt (Cooksley, Davis *et al.* 2010). Auch in *C. acetobutylicum* wäre eine Korrelation zwischen dem *agr*-abhängigen *Quorum sensing* System und der Aktivierung der Sporulation denkbar. So zeigten

Gene der Sporulations-bezogenen Sigma Faktoren F und G (*sigF*, *sigG*), deren Verantwortung in der Kontrolle früher Sporulations-Ereignisse liegt (Tomas, Alsaker *et al.* 2003), eine erhöhte Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2. Ein ähnliches Verhalten konnte für das Gen des SpoOJ Regulators (CA_P0177) beobachtet werden.

Im Vergleich dazu sind die Transkriptionsanalysen des Stammes *C. acetobutylicum* pDK3 zu sehen. Während die Gene des *agr* Locus (CA_C0078-CA_C0081) und der Sporulations-bezogenen Sigma Faktoren F und G (*sigF*, *sigG*) keine Expressionsänderungen zeigten, konnten für die kodierenden Gene der Sporenhülle *cotJ*, *cotF* und CA_C0686 eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Ein ähnliches Transkriptionsverhalten konnte für eines der paralogen σ^G -abhängigen SpoVT-Gene (CA_C3214) und für das Gen eines kleinen Säure-löslichen Sporen-Proteins (*sspA*) ermittelt werden.

Die Expressionsdaten und Annotationen der beschriebenen Gene sind in der Tabelle 7.7 im Anhang dargestellt.

Expressionen von Elektronentransport-Proteinen und Hydrogenasen

Neben dem Bcd-EtfA/B-Komplex (s. Tabelle 3.2), dessen Dehydrogenase Aktivität von beiden Untereinheiten des Elektronen-transferierenden Flavoproteins abhängig ist (Boynton, Bennet *et al.* 1996), verfügt *C. acetobutylicum* über eine weitere FAD/FMN-enthaltende Dehydrogenase mit den α - und β -Untereinheiten des Elektronen-übertragenden Flavoproteins (CA_C2542-CA_C2544). Der Enzym-Komplex, dessen explizite Funktion im Stoffwechsel noch unbekannt ist, zeigte eine signifikant erhöhte Expression im Stamm *C. acetobutylicum* pDK2. In den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 konnte indes eine erhöhte Expression der Gene CA_C2542-CA_C2544 in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero nachgewiesen werden. Mit der Genom-Sequenzierung von *C. acetobutylicum* konnten fünf Ferredoxine identifiziert werden (Nölling, Breton *et al.* 2001). Die Gene zweier Ferredoxin (CA_C0303; CA_C0105) zeigten in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 eine signifikant erhöhte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero. Dieses Expressionsverhalten der Gene veränderte sich zum Teil in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 (s. Tabelle 3.3). Für ein

weiteres Ferredoxin-Gen (CA_C3527) und ein Flavoprotein (CA_C0587) konnte in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 eine erhöhte Induktion beobachtet werden. *C. acetobutylicum* verfügt über 2 weitere Ferredoxine (CA_C0075, CA_C3621). In den Transkriptionsanalysen der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 konnten jedoch keine Expressionen dieser Gene ermittelt werden, da ihre Signal-Intensitäten zumeist unterhalb der des Hintergrunds verblieb (s. Tabelle 3.3).

Die Genomanalyse von *C. acetobutylicum* identifizierte drei Hydrogenasen. Die [FeFe]-Hydrogenasen (*hydA*, *hydB*) katalysieren die Reduktion von Protonen und sind hauptsächlich für die H₂-Produktion in der Zelle verantwortlich. Für die Gene *hydA*, *hydB*, *mbhL* und *mbhS* ([NiFe]-Hydrogenasen) war es jedoch nicht möglich in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 die Expressionsdaten logarithmiert zur Basis 2 auszudrücken, da ihre Signal-Intensität unterhalb der Hintergrund-Aktivität lag. Ein ähnliches Expressionsverhalten konnte in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 beobachtet werden. Die Expressionsdaten und Annotationen der aufgezeigten Gene sind vergleichend in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.3: Expressionsverhältnisse von Genen des Elektronentransports und der Hydrogenasen.

Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C0028	<i>hydA</i>	Hydrogenase	n.b.	-0,25
CA_C0075		Ferredoxin	n.b.	0,61
CA_C0105		Ferredoxin	-1,10	0,61
CA_C0303		Ferredoxin	-3,13	-2,69
CA_C0587		Flavoprotein	3,03	0,37
CA_C2542		FAD/FMN- enthaltende Dehydrogenase	2,43	-1,05

Ergebnisse

CA_C2543	<i>etfA</i>	Elektronen-Transfer Flavoprotein A- Untereinheit	2,19	-1,23
CA_C2544	<i>etfB</i>	Elektronen-Transfer Flavoprotein B- Untereinheit	2,10	-1,51
CA_C3230	<i>hydB</i>	Hydrogenase Untereinheit (Ferredoxin)	n.b.	n.b.
CA_C3527		Ferredoxin	1,12	n.b.
CA_C3621		Ferredoxin	n.b.	n.b.
CA_P0141	<i>mbhS</i>	Hydrogenase Untereinheit (klein)	n.b.	n.b.
CA_P0142	<i>mbhL</i>	Hydrogenase Untereinheit (groß)	n.b.	n.b.

Expression verschiedener Gene

Eisen stellt einen wesentlichen Bestandteil von vielen Enzymen dar. So benötigt beispielsweise die Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) Eisen für die Aceton-Bildung (Westheimer, 1963). In *E. coli* wurde ein System zur anaeroben Aufnahme von Eisen (*feo*) charakterisiert (Kammler, Schon *et al.* 1993). Mit Hilfe von Genomanalysen gelang es, ein putatives *feo* Operon (CA_C1029-CA_C1031) in *C. acetobutylicum*, bestehend aus zwei orthologen FeoA-Proteinen und einer FeoB-ähnlichen GTPase, zu identifizieren. Sowohl für die Gene der orthologen FeoA-Proteine als auch für die FeoB-ähnliche GTPase konnte eine erhöhte Transkription in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 nachgewiesen werden. Zwei Gene eines putativen Eisen-Transport Operons (CA_C1989-CA_C1990) zeigten indes nur eine leichte Expression unter genannten Bedingungen (s. Tabelle 7.8, Anhang).

Neben den Genen für die Eisen-Aufnahme bzw. -Transportes zeigte ein putatives Operon zur Zellstabilität eine signifikant verstärkte Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2. Ein *S-Layer* (*surface-layer*) ist eine proteinhaltige zweidimensionale parakristalline Schicht, welche die Oberfläche vegetativer Zellen

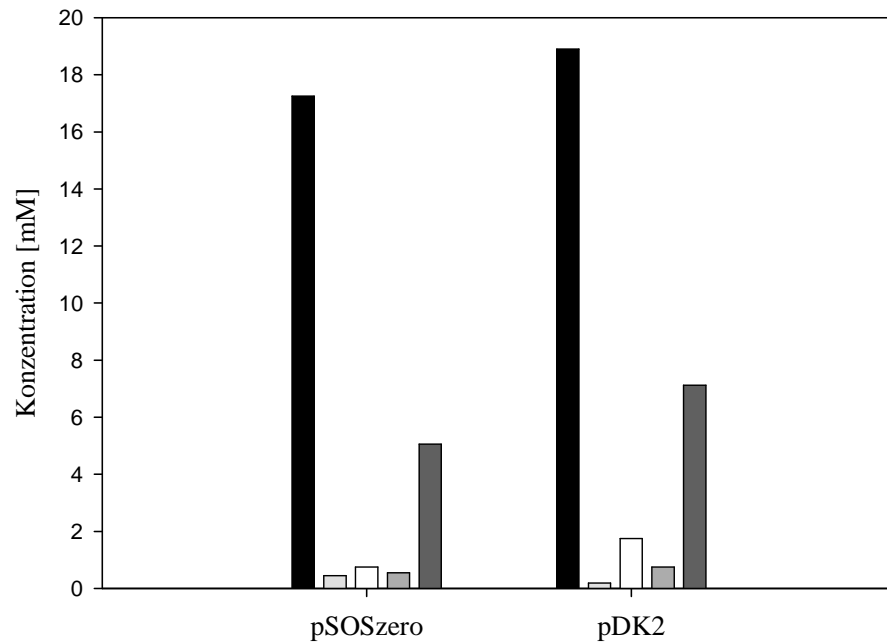
umgibt. Sie dient als molekulares Sieb und übt protektive Funktionen gegenüber verschiedensten Faktoren aus. Dabei kann sie als Stützmaterial Liposomen und einzelne Lipide enthalten (Sara and Sleytr 2000). Ein Lipoprotein und ein putatives *S-layer* Protein aus *C. acetobutylicum* sind als putatives Operon aufgeführt. In *C. acetobutylicum* pDK2 konnten für die Gene des Lipoproteins (CA_P0058) und des putativen *S-layer* Proteins (CA_P0057) eine verstärkte Transkription nachgewiesen werden.

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Gene zeigten in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 keine erhöhten Expressionen. Die Expressionsdaten und Annotation der Gene sind der Tabelle 7.8 des Anhangs zu entnehmen.

3.1.6.1.1 Analyse der Fermentationsprodukte von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 während des logarithmischen Wachstums

Mit der Untersuchung des Transkriptionsverhaltens der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 basierend auf DNA-Microarrays folgte eine vergleichende Analyse der Fermentationsprodukte zwischen den Stämmen mit reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität und der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero. Für die Verifizierung der transkriptionellen Daten auf biochemischer Ebene dienten zum einen die Kulturüberstände der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pSOSzero zu vergleichbaren optischen Dichten der logarithmischen Wachstumsphase (s. Abbildung 3.16 A) und zum anderen die Kulturüberstände zum Zeitpunkt der Zellernte für die Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 (s. Abbildung 3.10 B und Abbildung 3.16 B).

A



B

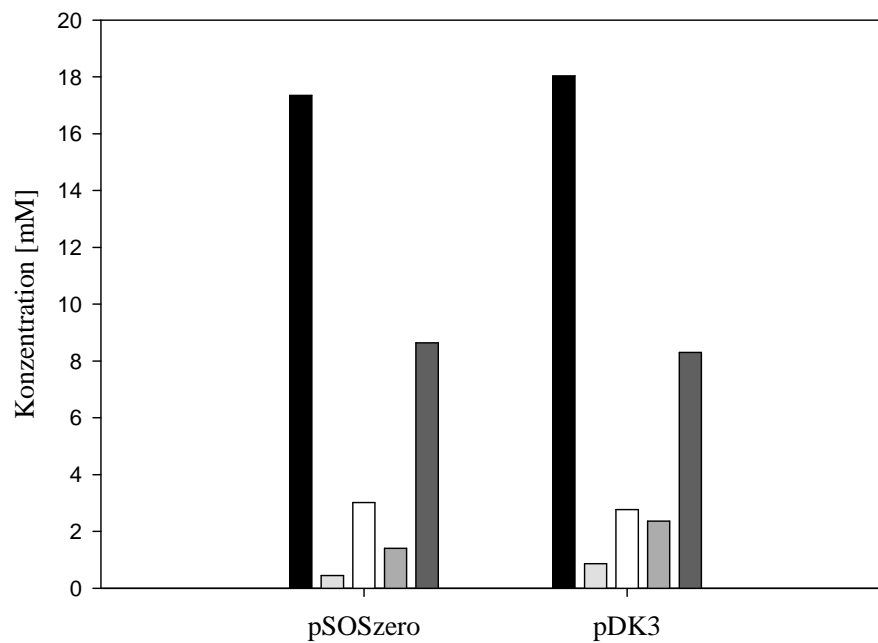


Abbildung 3.16: Quantitative Analyse der Fermentationsprodukte während des logarithmischen Wachstums. **A:** Dargestellt sind die Konzentrationen der Fermentationsprodukte von *C. acetobutylicum* pDK2 ($OD_{600} = 0,78$) und *C. acetobutylicum* pSOSzero ($OD_{600} = 0,9$) zu vergleichenden optischen Dichten. **B:** Dargestellt sind die Konzentrationen der Fermentationsprodukte von *C. acetobutylicum* pDK3 und *C. acetobutylicum* pSOSzero zum Zeitpunkt der Zellernte für die Transkriptionsanalysen. Ausgehend von je 100 ml CG-Medium mit Clarithromycin versehener Batch-Kultur wurden die Fermentationsprodukte Ethanol (schwarzer Balken), Aceton (hellgrauer Balken), Acetat (weißer Balken), Butanol (mittelgrauer Balken) und Butyrat (dunkelgrauer Balken) zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine repräsentative Einzelmessung.

Mit Hilfe der biochemischen Analyse der Fermentationsprodukte konnten die Expressionsdaten einzelner Gene des fermentativen Stoffwechsels in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 verifiziert werden. So konnte bei genauerer Betrachtung der Abbildung 3.16 A eine vermehrte Produktion der solventogenen Lösungsmittel mit 18,89 mM Ethanol und 0,74 mM Butanol in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero mit 17,25 mM Ethanol und 0,54 mM Butanol nachgewiesen werden. Die signifikant verstärkten Expressionen der Gene *adhE1* und *bdhB* in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 (s. Tabelle 3.2) werden durch die frühe Anhäufung der solventogenen Lösungsmittel Ethanol und Butanol bestätigt. Die dreifache Expression des *adc* Gens in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero lässt eine kontinuierliche Steigerung der Aceton-Konzentration erwarten. Tatsächlich konnten nur geringen Konzentrationen des solventogenen Lösungsmittels detektiert werden. Hier ist vermutlich der Beginn der Aceton-Produktion und die Tatsache, dass nur sehr wenige Säuren im Medium vorlagen, die aufgenommen und zu Butanol umgewandelt werden können, ausschlagend für dessen Expressionsverhalten. Die Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 zeigten eine zweifache Induktion des Acetat-Kinase Gens *ackA*, während für das Gen der Butyrat-Kinase (*buk*) keine Expressionsänderung beobachtet werden konnte. Die ermittelten Konzentrationen der acidogenen Fermentationsprodukte bestätigen teilweise dieses Expressionsverhalten.

Mit Betrachtung der Abbildung 3.16 B wird eine vermehrte Produktion der solventogenen Lösungsmittel mit 18,04 mM Ethanol, 0,86 mM Aceton und 2,36 mM Butanol von *C. acetobutylicum* pDK3 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero mit 17,35 mM Ethanol, 0,45 mM Aceton und 1,40 mM Butanol ersichtlich. Diese Beobachtung korreliert mit der signifikant verstärkten Expression der Gene *adhE1*, *adc* und *bdhB* unter verminderter Hydrogenase HydA Aktivität. Demgegenüber ist die Produktion acidogener Fermentationsprodukte zu sehen. Für die Stämme *C. acetobutylicum* pDK3 und *C. acetobutylicum* pSOSzero konnten vergleichbare Mengen Acetat und Butyrat ermittelt werden. Dieses Fermentationsverhalten steht in Korrelation zu den Expressionsdaten der Gene *ackA* und *buk*, deren Transkription sich unter den vorherrschenden Bedingungen nicht änderte.

3.1.6.1.2 Bestimmung der Glukose-Konzentration in Kulturen von *C. acetobutylicum* ATCC pDK3 und *C. acetobutylicum* pSOSzero während des logarithmischen Wachstums

Für die quantitative Analyse der Glukose-Konzentration zum Zeitpunkt der Zellernte beider Stämme (s. Abbildung 3.10 B) wurden die Kulturüberstände, wie unter 2.8.2 beschrieben, enzymatisch untersucht. Als Kontrolle diente reines CG-Medium. Anhand der Untersuchung konnten Unterschiede hinsichtlich der Glukose-Verwertung beider Stämme beobachtet werden (s. Abbildung 3.17).

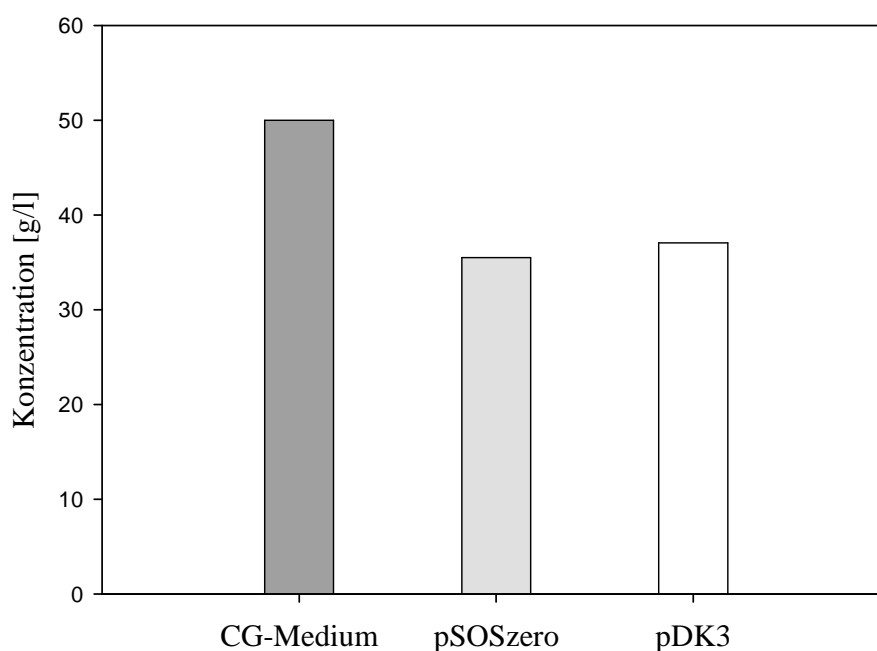


Abbildung 3.17: Quantitative Analyse der Glukose-Konzentration von *C. acetobutylicum* pDK3 und *C. acetobutylicum* pSOSzero. Dargestellt sind die Glukose-Konzentrationen von reinem CG-Medium (grauer Balken) und den Kulturüberstände von *C. acetobutylicum* pSOSzero (hellgrauer Balken) und *C. acetobutylicum* pDK3 (weißer Balken) zum Zeitpunkt der Zellernte. Die enzymatische Messung jeder Probe wurde dreifach durchgeführt und der Mittelwert bestimmt. Erläuterung im Text.

Mit Betrachtung der Abbildung 3.17 werden Unterschiede seitens des Glukose-Verbrauches ersichtlich. Während *C. acetobutylicum* pDK3 zum Zeitpunkt der Zellernte eine Glukose-Konzentration von 37,07 g/l aufwies, konnte für die Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero eine Konzentration von 35,49 g/l ermittelt werden. Der höhere Glukose-Verbrauch von *C. acetobutylicum* pSOSzero geht mit

der Induktion eines kodierenden Gens der Glukose PTS IICBA-Komponente (CA_C0570) einher (s. Tabelle 7.6, Anhang).

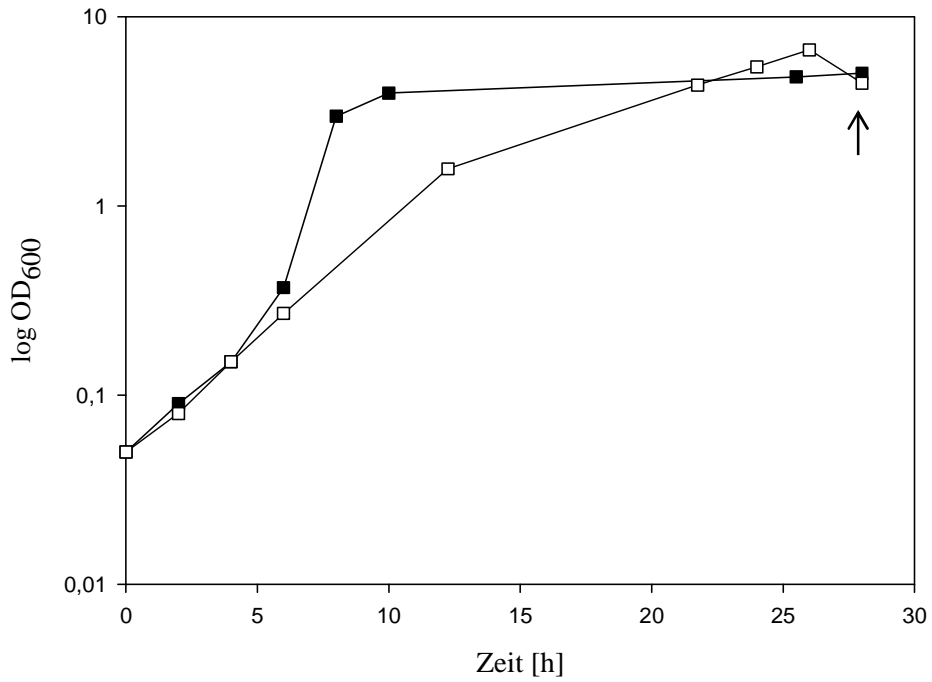
Die Glukose-Konzentration des Stammes *C. acetobutylicum* pDK2 wurde in der logarithmische Wachstumsphase leider nicht bestimmt.

Mit den Transkriptionsanalysen, den Untersuchungen der Fermentationsprodukte und der Bestimmung der Glukose-Konzentration von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei logarithmischen Wachstum drängte sich die Frage auf, welchen Einfluss eine reduzierte Hydrogenase HydA Aktivität auf die Genexpression und Produktion acidogener und solventogener Fermentationsprodukte während des stationären Wachstums ausüben würde. Um dieser Fragestellung nachzugehen, galt es das Transkriptions- und Fermentationsverhalten sowie den Glukose-Verbrauch der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 während des stationären Wachstums zu untersuchen.

3.1.6.2 Genexpressionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero bei stationären Wachstum

Für eine vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2, *C. acetobutylicum* pDK3 und der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero wurden die Zellen der Stämme in je 100 ml CG-Medium mit Clarithromycin angezogen. Unter stetiger Kontrolle der optische Dichte ($\lambda = 600$ nm) und des pH-Wertes erfolgte die Zellernte der Batch-Kulturen von *C. acetobutylicum* pDK2 (s. Abbildung 3.18 A), *C. acetobutylicum* pDK3 (s. Abbildung 3.18 B) und der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero (s. Abbildung 3.18 A/B) innerhalb der stationären Wachstumsphase (OD = 4,4-6,1). Die RNA wurde wie unter 2.5.2 beschrieben, isoliert und die Transkription mittels DNA-Microarray verfolgt.

A



B

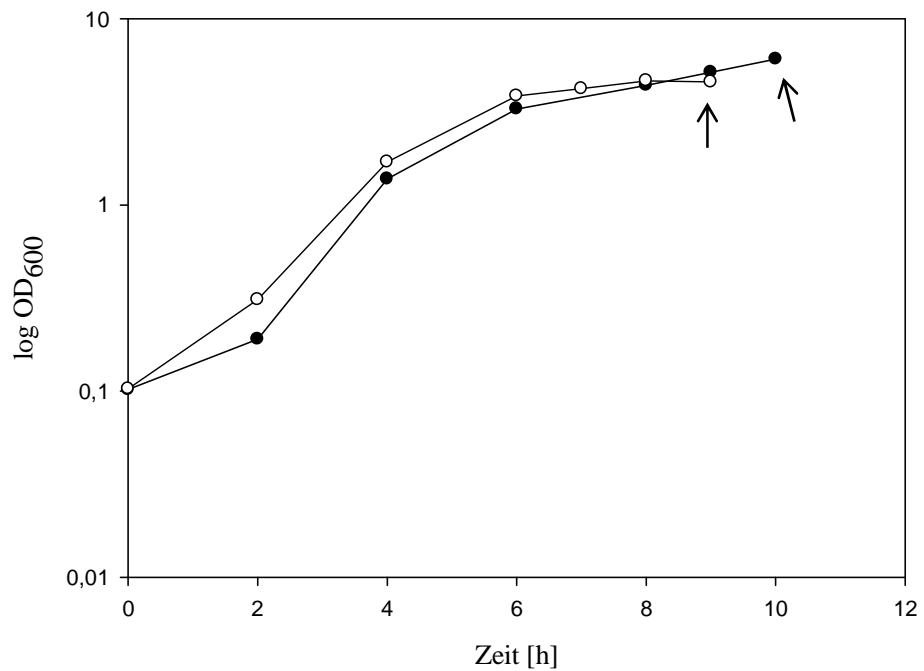


Abbildung 3.18: Wachstumskurven für die Transkriptionsanalysen bei stationärem Wachstum.

A: Wachstum der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 (■) und *C. acetobutylicum* pSOSzero (□).
B: Wachstum der Stämme *C. acetobutylicum* pDK3 (●) und *C. acetobutylicum* pSOSzero (○). Die Kulturen wurden je in 100 ml CG-Medium unter Verwendung von Clarithromycin angezogen. Der Zeitpunkt der Zellernte der Stämme ist mit Hilfe eines Pfeils gekennzeichnet.

Expression der Gene des fermentativen Stoffwechsels

Der Fokus des Interesses der durchgeführten Transkriptionsanalysen lag auf den Genen des fermentativen Stoffwechsels der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Für eine übersichtliche Darstellung wurden die Transkriptionsdaten aus der stationären Wachstumsphase beider Stämme in zwei Graphiken zusammengestellt (s. Abbildung 3.19 und 3.20). In Abhängigkeit der Antisense-RNA Konstruktlänge und der reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität konnten signifikante Änderungen der Expression von Genen der Acido- und Solventogenese nachgewiesen werden. Die Expressionsdaten und Funktionen aller Gene sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

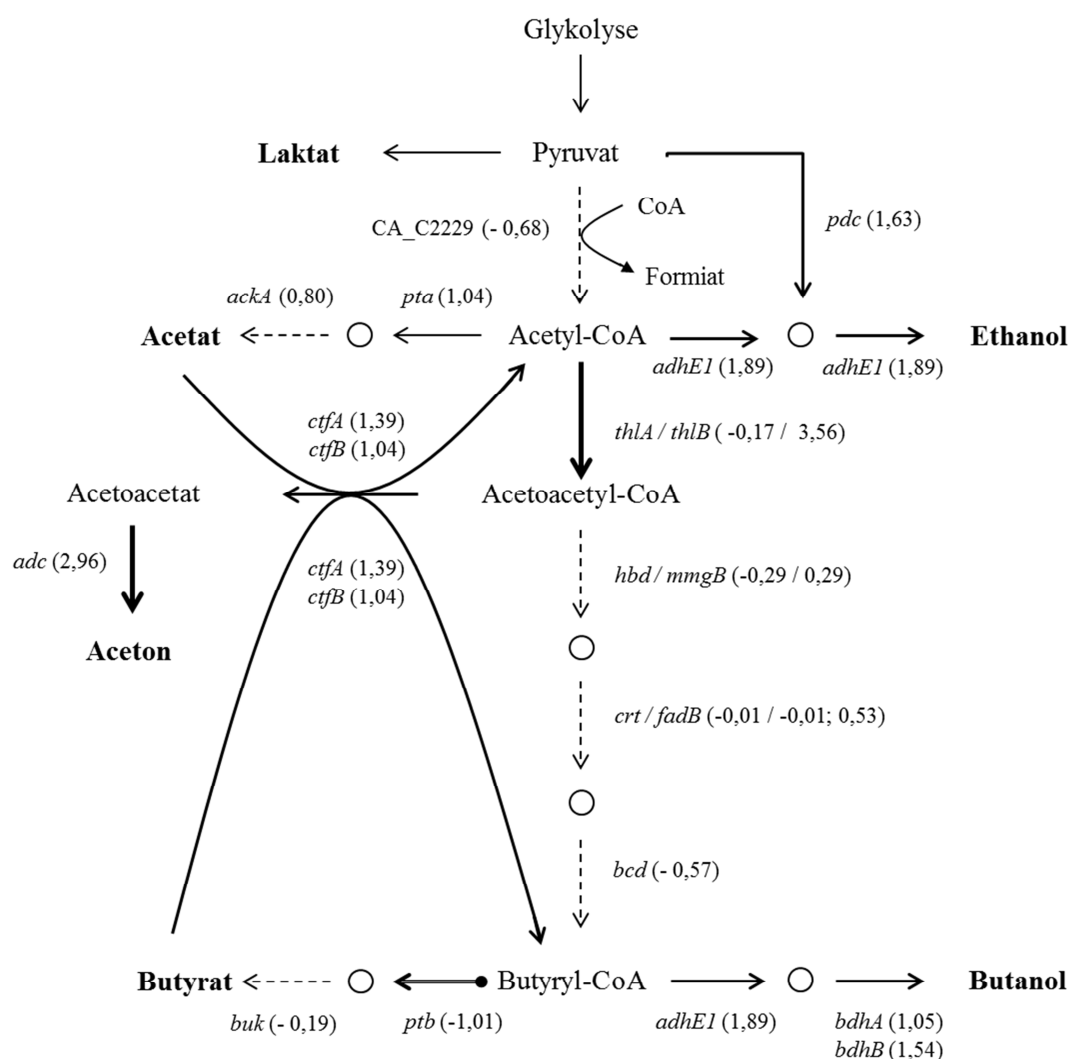


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung des fermentativen Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* pDK2 bei stationärem Wachstum. Die Expressionsdaten geben das Expressionsverhältnis der Gene von *C. acetobutylicum* pDK2 und der Vektorkontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero wieder. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkte Genexpression in dem Stamm *C. acetobutylicum* ATCC pDK2 (\longrightarrow). Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Genexpression in Vektorkontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero ($\bullet\longrightarrow$) hin. Gene, welche in beiden Stämmen keine Expressionsänderungen aufzeigten, sind durch einen gestrichelten Pfeil gekennzeichnet ($- \longrightarrow$). Die Stärke der Reaktionspfeile symbolisiert die Expressionsstärke des Gens. Zwischenprodukte im Stoffwechsel (\circ). Es handelt sich um eine logarithmische Darstellung der Expressionsdaten und repräsentative Einzelmessungen.

Vergleichend zu der Abbildung 3.19 sind die Transkriptionsdaten des Stammes *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum zu betrachten (s. Abbildung 3.20).

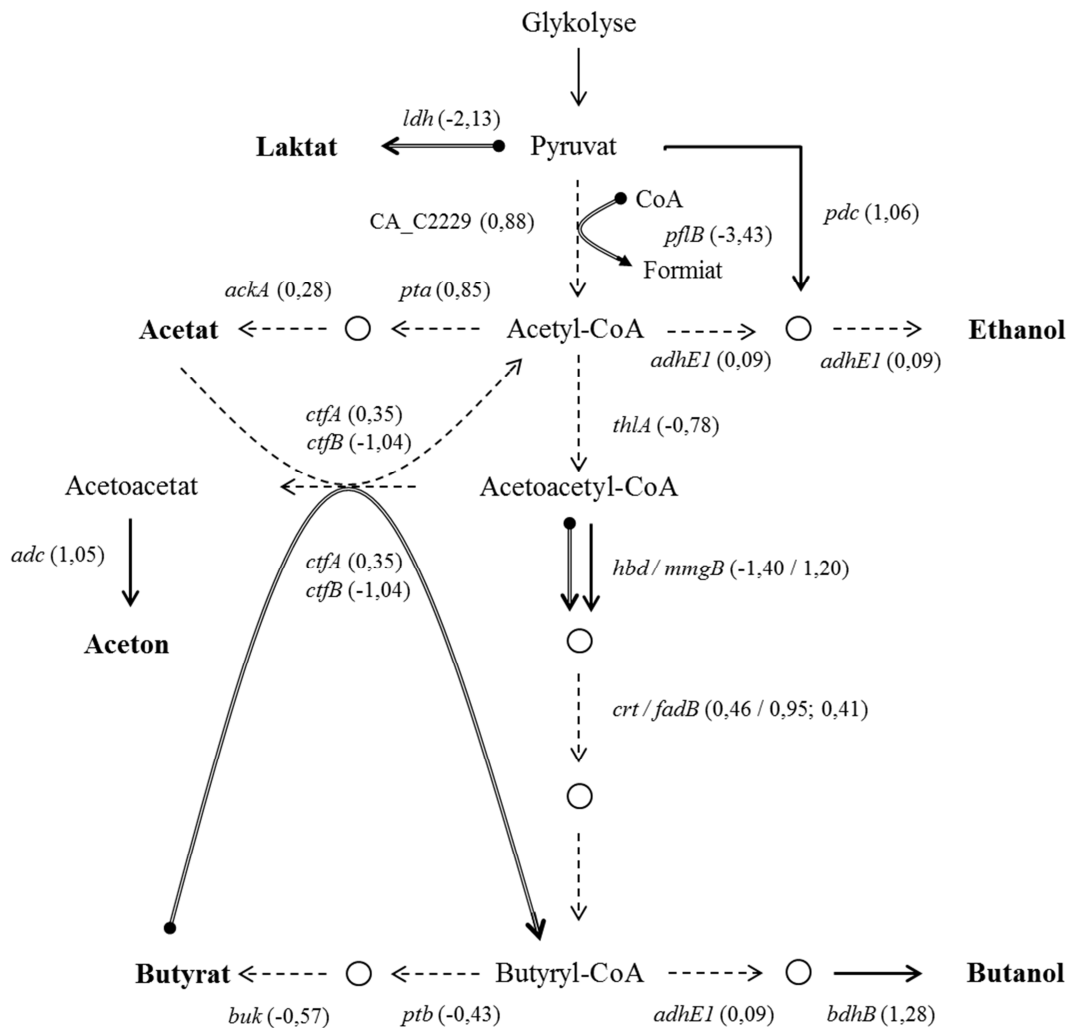


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung des fermentativen Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum. Die Expressionsdaten geben das Expressionsverhältnis der Gene von *C. acetobutylicum* pDK3 und der Vektorkontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero wieder. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkte Genexpression in dem Stamm *C. acetobutylicum* ATCC pDK3 (\longrightarrow). Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Genexpression in Vektorkontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero ($\bullet\longrightarrow$) hin. Gene, welche in beiden Stämmen keine Expressionsänderungen aufzeigten, sind durch einen gestrichelten Pfeil gekennzeichnet ($- \longrightarrow$). Die Stärke der Reaktionspfeile symbolisiert die Expressionsstärke des Gens. Zwischenprodukte im Stoffwechsel (○). Es handelt sich um eine logarithmische Darstellung der Expressionsdaten und repräsentative Einzelmessungen

An Oxidation von Pyruvat sind in *C. acetobutylicum* drei verschiedene Enzyme beteiligt. Die Pyruvat-Decarboxylase setzt Pyruvat zu CO_2 und Acetaldehyd um. Das kodierende Gen *pdc* zeigte in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 ein ähnlich starkes Expressionsniveau. In Kontrast dazu

sind die Transkriptionsdaten der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*) und ihres Aktivierungsenzyms (*pflA*) zu sehen. Während *pflB* und *pflA* in *C. acetobutylicum* pDK2 keine Änderungen seitens ihrer Expressionen aufwiesen, konnte für beide Gene in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 eine signifikant verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero ermittelt werden. Die Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase stellt den Haupt-Weg der Oxidation von Pyruvat dar. Das kodierende Gen CA_C2229 zeigte sowohl im Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 als auch im Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 keine Expressionsänderung.

Im Gegenzug dazu unterschieden sich die an der Acetat- bzw. Butyratbildung beteiligten Gene in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 hinsichtlich ihrer Expression. Während *pta* eine zweifach höhere Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 aufwies, konnte für das Gen in *C. acetobutylicum* pDK3 keine Expressionsänderung nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte *ptb* in den Transkriptionanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 eine zweifache höhere Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero. Im Unterschied dazu konnte für *ptb* in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 keine Änderung der Expression nachgewiesen werden. Ein ähnliches Expressionsverhalten zeigten die kodierenden Gene der Acetat- bzw. Butyratkinase (*ackA*, *buk*) in beiden Stämmen.

Im Kontrast dazu sind die Transkriptionsdaten der paralogen Gene *thlA* und *thlB* zu sehen. Während für das chromosomal lokalisierte *thlA* in beiden Stämmen keine Änderung seitens der Expression beobachtet werden konnte, zeigte das auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisierte *thlB* eine signifikant verstärkte Transkription *C. acetobutylicum* pDK2.

Mit Hilfe der Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* konnten zwei Sets von chromosomal lokalisierten Genen, welche an der Umsetzung von Acetoacetyl-CoA zu Crotonyl-CoA beteiligt sind, identifiziert werden (Nölling, Breton *et al.* 2001). Für die kodierenden Gene der 3-Hydroxybutyryl-CoA- Dehydrogenase (*hbd*, *mmgB*) und der Enoyl-CoA Hydratase (*crt*, CA_C2012, CA_C2016) konnten verschiedene Expressionsdaten in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 ermittelt werden. Während die Gene *crt*, CA_C2012, CA_C2016 in beiden Stämmen keine Expressions-änderungen aufwiesen, zeigte *hbd* in der Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 eine erhöhte Induktion in der

Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero. Im Gegensatz dazu zeigte *mmgB* eine deutlich erhöhte Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3.

Für die kodierenden Gene des Bcd-EtfA/B-Komplex konnten in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 ähnliche Expressionsdaten ermittelt werden. Die Elektronen-übertragenden α - und β -Untereinheiten eines Flavoproteins (*etfA*, *etfB*) zeigten in beiden Transkriptionsanalysen eine erhöhte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero, wenngleich für *bcd* keine Expressionsänderungen beobachtet werden konnten.

Der Organismus *C. acetobutylicum* ist durch die Expression der Gene *ctfA/B* zur Reabsorption der produzierten Säuren Acetat, Butyrat befähigt. Aus diesen entstehen die solventogenen Lösungsmittel Ethanol, Butanol und Aceton. Die Gene des *sol*-Operons *adhE1*, *ctfA* und *ctfB* zeigten eine signifikant verstärkte Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2. Ein ähnliches Expressionsverhalten konnte für das Gen der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) dokumentiert werden. Während für *adc* eine signifikant verstärkte Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 nachgewiesen werden konnte, lag das Gen in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 lediglich zweifach induziert vor. Für das kodierende Gen der Butanol-Dehydrogenase *bdhB* sowie für CA_P0059 konnten gleichstark signifikante Expressionen in beiden Stämme beobachtet werden.

Die Reduktion von Pyruvat zu L-Laktat wird von der L-Laktat-Dehydrogenase katalysiert. Das Gen *ldh* zeigten in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 eine erhöhte Induktion in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero. Für *ldh* konnte indes in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 keine Expression ermittelt werden, da die Signal-Intensität unterhalb der Hintergrund-Aktivität lag.

Die Expressionen und Annotationen sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Ergebnisse

Tab. 3.4: Expressionsverhältnisse von Genen des fermentativen Stoffwechsels in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3, wohingegen Werte kleiner -1 auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero deuten. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C3299	<i>bdhA</i>	Butanol- Dehydrogenase A	1,05	0,41
CA_C3298	<i>bdhB</i>	Butanol- Dehydrogenase B	1,54	1,28
CA_C3076	<i>ptb</i>	Phosphat-Butyryl- transferase	-1,01	-0,43
CA_C3075	<i>buk</i>	Butyrat-Kinase	-0,19	-0,57
CA_C2873	<i>thlA</i>	Acetyl-CoA Acetyltransferase	-0,17	-0,78
CA_C2712	<i>crt</i>	Enoyl-CoA Hydratase	-0,01	-0,46
CA_C2711	<i>bcd</i>	Butyryl-CoA- Dehydrogenase	-0,57	n.b.
CA_C2710	<i>etfB</i>	Elektronen-Transfer Flavoprotein B-Untereinheit	-0,65	-1,65
CA_C2709	<i>etfA</i>	Elektronen-Transfer Flavoprotein A-Untereinheit	-1,09	-1,39
CA_C2708	<i>hbd</i>	3-Hydroxybutyryl- CoA- Dehydrogenase	-0,29	-1,40
CA_C2499		Pyruvat-Ferredoxin- Oxidoreduktase	n.b.	n.b.
CA_C2229		Pyruvat-Ferredoxin- Oxidoreduktase	-0,68	-0,88

Ergebnisse

CA_C2016	<i>fadB</i>	Enoyl-CoA Hydratase	0,53	0,41
CA_C2012	<i>fadB</i>	Enoyl-CoA Hydratase	-0,01	0,95
CA_C2009	<i>mmgB</i>	3-Hydroxybutyryl- CoA- Dehydrogenase	0,29	1,20
CA_C1743	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase	0,80	0,28
CA_C1742	<i>pta</i>	Phosphat- Acetyltransferase	1,04	0,85
CA_C0981	<i>pflA</i>	Pyruvat-Formiat- Lyase aktivierendes Enzym	0,86	-3,21
CA_C0980	<i>pflB</i>	Pyruvat-Formiat- Lyase	n.b.	-3,42
CA_C0267	<i>ldh</i>	L-Laktat- Dehydrogenase	n.b.	-2,13
CA_P0165	<i>adc</i>	Acetoacetat- Decarboxylase	2,96	1,05
CA_P0164	<i>ctfB</i>	Butyrat-Acetoacetat- CoA-Transferase (Untereinheit B)	1,04	-1,04
CA_P0163	<i>ctfA</i>	Butyrat-Acetoacetat- CoA-Transferase (Untereinheit A)	1,39	0,35
CA_P0162	<i>adhE1</i>	Aldehyd- Dehydrogenase	1,89	0,09
CA_P0078	<i>thlB</i>	Acetyl-CoA Acetyltransferase	3,56	n.b.
CA_P0059		Alkohol- Dehydrogenase	1,96	1,59
CA_P0035	<i>adhE2</i>	Aldehyd-Alkohol- Dehydrogenase	n.b.	n.b.

CA_P0025	<i>pdc</i>	Pyruvat- Decarboxylase	1,36	1,06
----------	------------	---------------------------	------	------

Expression von Genen verschiedener Transportsysteme

Wie bereits in den vorangehenden Abschnitten dieser Arbeit beschrieben (s. 3.1.6.1), verfügt *C. acetobutylicum* über verschiedene Transportsysteme mit deren Hilfe mögliche C-Quellen aufgenommen und verwertet werden können. Eines dieser zuckerspezifischen Transportsysteme ist das Fruktose-PTS, dessen Gene in einem polycistronischen Operon organisiert sind (s. Abbildung 3.13). Die Transkription des Gens eines DeoR-ähnlichen Transkriptionsregulators (CA_C0231) zeigte in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 einen zweifach-erhöhten Wert. Darüber hinaus konnten für die Gene der 1-Phosphofruktokinase (CA_C0232) und der *downstream* lokalisierten PTS EnzymIIBC-Komponente (CA_C0234) eine signifikant verstärkte Expression in *C. acetobutylicum* pDK2 nachgewiesen werden. Die Expression des kodierenden Gens einer PTS EnzymIIA-Komponente (CA_C0233) veränderte sich bei den gewählten Bedingungen nicht.

In den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 konnte lediglich für das Gen CA_C0234 eine erhöhte Expression nachgewiesen werden, wohingegen die anderen Gene des polycistronischen Operon keine Expressionsänderung aufzeigten. Durch die Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* konnten Gene für zwei Phosphotransferase-Systeme identifiziert werden, welche große Sequenzhomologien zu Mannose/Fruktose Phosphotransferase-Systeme in anderen Organismen zeigten (Servinsky, Kiel *et al.* 2010). Eines dieser Phosphotransferase-Systeme ist auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisiert (CA_P0066-CA_P0068). Die Gene CA_P0067-CA_P0068 zeigten unter verminderter Hydrogenase HydA Aktivität in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 eine erhöhte Induktion. Ein weiteres substrat-spezifisches PTS ist das Laktose-PTS (s. Abbildung 3.21).

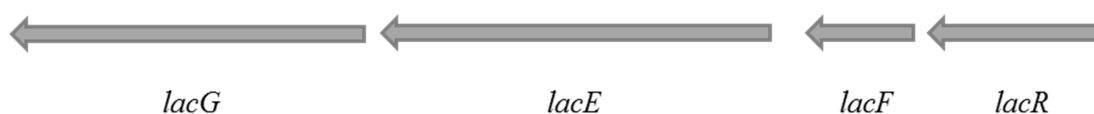


Abbildung 3.21: Chromosomale Anordnung des Laktose-Operons. Erläuterung siehe Text.

Dieses PTS wird von zwei Transkriptionseinheiten (CA_C2964-CA_C2963; CA_C2966-CA_C2965) kodiert. Dabei werden die EIIB und EIIC Domänen in einem ORF (*lacE*) gelesen und mit dem Gen der 6-Phospho- β -D-Galaktosidase (*lacG*) co-transkribiert. Die Gene einer EIIA-Komponente (*lacF*) und eines DeoR-ähnlichen Regulators (*lacR*) sind *upstream* von *lacE* lokalisiert. In dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 zeigten die Gene *lacG*, *lacE* und *lacR* eine signifikant verstärkte Expression, wohingegen für *lacF* keine Änderung seitens der Expression beobachtet werden konnte. Für einen putativen Xylulose:Protonensymporter konnte ebenfalls in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden.

Die Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 zeigten indes weder für die Gene des Laktose-PTS noch für den putativen Xylulose:Protonensymporter CA_C3422 eine erhöhte Expression.

Neben den zuckerspezifischen Phosphotransferasesystemen (PTS) verfügt der Organismus über verschiedene ABC-Transporter. Ein Natrium ABC-Transportsystem (CA_C3550-CA_C3551) zeigte bei verminderter Hydrogenase HydA Aktivität in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 eine erhöhte Expression. Des Weiteren konnte für ein Eisen reguliertes ABC-Transportsystem (CA_C3288-CA_C3290) in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Eine übersichtliche Darstellung der Expressionsdaten ist in der Tabelle 7.9 im Anhang zu finden.

Expressionen von Elektronentransport-Proteinen und Hydrogenasen

Für die FAD/FMN-enhaltende Dehydrogenase (CA_C2542) mit den α - und β -Untereinheiten des Elektronen-übertragenden Flavoproteins (*etfA*, *etfB*) konnten in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 unterschiedliche Expressionsdaten ermittelt werden. Während die Gene CA_C2542 und *etfA* eine signifikant verstärkte Expression in beiden Stämmen aufzeigten, verblieb die Signal-Intensität des *etfB* unterhalb der des Hintergrunds oder zeigte keine Expressionsänderung.

Für die kodierenden Gene der fünf Ferredoxine konnten ebenfalls unterschiedliche Transkriptionsdaten beobachtet werden. Während in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 die Signal-Intensität von CA_C0105 unterhalb der des

Hintergrunds und somit außerhalb der Ausschlusskriterien für die Transkriptionsanalysen verblieb, konnte für das Gen in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 eine signifikant verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero beobachtet werden. Die vier verbleibenden Ferredoxine (CA_C0075, CA_C0303, CA_C3527, CA_C3621), die [NiFe]-(*mbhL*, *mbhS*) und die [FeFe]-Hydrogenasen (*hydA*, *hydB*) zeigten ein unauffälliges Expressionsverhalten. Ihre Signal-Intensitäten verblieben entweder unterhalb der des Hintergrunds oder für ihre Gene konnten keine Expressionsänderungen nachgewiesen werden. Die Expressionsdaten und Annotationen der Gene sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Tab. 3.5: Expressionsverhältnisse Elektronentransport-Proteinen und Hydrogenasen in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3, wohingegen Werte kleiner -1 auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero deuten. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C0028	<i>hydA</i>	Hydrogenase	n.b.	0,47
CA_C0075		Ferredoxin	n.b.	n.b.
CA_C0105		Ferredoxin	n.b.	-3,63
CA_C0303		Ferredoxin	0,50	-0,59
CA_C2542		FAD/FMN- enthaltende Dehydrogenase	1,94	1,09
CA_C2543	<i>etfA</i>	Elektronen-Transfer Flavoprotein A- Untereinheit	1,93	1,12
CA_C2544	<i>etfB</i>	Elektronen-Transfer Flavoprotein B- Untereinheit	n.b.	0,41

Ergebnisse

CA_C3230	<i>hydB</i>	Hydrogenase Untereinheit (Ferredoxin)	n.b.	n.b.
CA_C3527		Ferredoxin	n.b.	-0,17
CA_C3621		Ferredoxin	n.b.	n.b.
CA_P0141	<i>mbhS</i>	Hydrogenase Untereinheit (klein)	n.b.	n.b.
CA_P0142	<i>mbhL</i>	Hydrogenase Untereinheit (groß)	n.b.	n.b.

Expression von Genen der Chorismat-Biosynthese

Der Shikimat-Weg ist ein biochemischer Stoffwechsel-Weg bestehend aus sieben enzymatischen Reaktionen, der die Biosynthese des Intermediats Chorismat unterstützt (Ehammer, Rauch *et al.* 2007). Mit Hilfe der Genomanalyse von *C. acetobutylicum* konnte das *aro*-Operon (CA_C0892-CA_C0899) identifiziert werden (s. Abbildung 3.22).

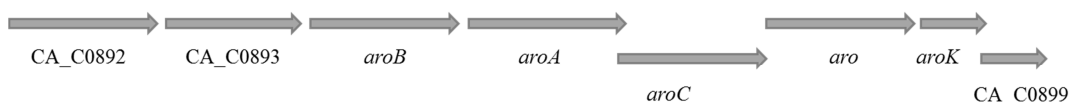


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung des putativen *aro*-Operons in *C. acetobutylicum*. Erläuterung siehe Text.

Die kodierenden Gene sind für die Synthese von Chorismat und die Entstehung der Ausgangsprodukte der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin verantwortlich. Darüber hinaus wird Chorismat für die Synthese von Vitamin K₂ (Menaquinon) benötigt (Bentley 1990). Vitamin K₂ nimmt eine essentielle Rolle in einzelnen anaeroben Elektronen-Transportsystemen in *E. coli* ein (Daruwala, Bhattacharyya *et al.* 1997). In dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 zeigten die Gene CA_C0892-CA_C0896 eine deutliche Induktion. Ein ähnliches Expressionsverhalten wäre für *aro*, *aroK* und CA_C0899 zu erwarten. Unterdessen zeigte *aro* keine signifikante Änderung der Expression und für die Gene *aroK* und

CA_C0899 konnten aufgrund ihrer geringen Signal-Intensitäten keine Expressionsdaten ermittelt werden.

Für die Gene des putativen *aro*-Operons konnten in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 keine erhöhten Expressionen beobachtet werden. Die Expressionsdaten und Annotation der Gene sind in der Tabelle 7.10 im Anhang zu finden.

Expression von Genen der Biotin-Synthese

Biotin stellt einen essentiellen Co-Faktor für eine kleine Familie von carboxylierenden und decarboxylierenden Enzymen dar. Dabei fungiert es als covalente Bindungsstelle für CO₂ (Chapman-Smith and Cronan 1999). Die Biotin-abhängigen Enzyme sind u.a. in der Glukoneogenese, dem Fettsäure- und dem Aminosäure-Metabolismus involviert. Mit Hilfe der Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* konnten einzelne Gene der Biotin-Synthese identifiziert werden. Das putative Operon CA_C1360-CA_C1362 (*bioY*, *bioD*, *bioA*) ist an der Bildung von Dithiobiotin beteiligt. Mit der Insertion von Schwefel wird aus Dithiobiotin Biotin synthetisiert. Diese Reaktion wird von der Biotin-Synthase (*bioB*) katalysiert. In dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 konnten für die Gene *bioY*, *bioD* und *bioA* eine signifikant verstärkte Expression und für *bioB* eine erhöhte Induktion nachgewiesen werden.

Dagegen konnten für die Gene der Biotin-Synthese in den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 keine Expressionsdaten ermittelt werden, da ihrer Signal-Intensitäten unterhalb der des Hintergrunds lagen. Die Expressionsdaten sind in der Tabelle 7.11 im Anhang zu finden.

Expression von Genen der Fettsäure-Biosynthese und der Sporulation

Die Fettsäuresynthese beschreibt die stufenweise Anlagerung eines Malonyl-CoA an ein Acetyl-Molekül. In *C. acetobutylicum* sind elf Gene (CA_C3568-CA_C3579) an der Fettsäuresynthese beteiligt und in einem Operon (*fab*) zusammengefasst. Neben zwei Untereinheiten einer Acetyl-CoA Carboxylase (CA_C3568, CA_C3569) umfasst das *fab*-Operon eine β -Ketoacyl-acyl Carrier Protein-Synthase III (*fabH*). Dieses Protein katalysiert die Kondensation von Malonyl-Acyl und Acyl-CoA (Khandekar, Gentry *et al.* 2001) und stellt, wie in *B. subtilis* gezeigt, einen

essentiellen Faktor in der Synthese verzweigtkettiger Fettsäuren dar (Choi, Heath *et al.* 2000). Im Zuge der Transkriptionsanalysen konnte in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 mit reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität für das Gen eines Transkriptionsregulators (CA_C3579) und *fabH* eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Derweil waren für die Gene *accD*, *accB*, *fabF*, *fabG*, CA_C3576 und *acp* eine erhöhte Transkription unter letztgenannter Bedingung zu beobachten. Im Gegenzug dazu zeigten die Gene *accA*, *accC*, *fabZ* und *fabD* keine Änderungen der Expression.

Für die Gene der Fettsäure-Biosynthese konnten indes in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 keine erhöhten Expressionen nachgewiesen werden.

Anhand verschiedener Studien in *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass die Fettsäuresynthese für die Sporulation des Organismus erforderlich ist (Schujman, Grau *et al.* 1998). Des Weiteren scheinen beteiligte Gene des Fettsäure-Metabolismus direkt von Spo0A reguliert zu werden (Fawcett, Eichenberger *et al.* 2000; Molle, Fujita *et al.* 2003). Mit der Induktion einzelner an der Fettsäuresynthese beteiligter Gene konnten erhöhte Expressionen von Genen der Sporulation in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 beobachtet werden. Die Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 zeigten dabei eine erhöhte Induktion der kodierenden Gene des Spo0A Regulators und des Sigma-Faktors G (*sigG*).

Ein ähnliches Expressionsverhalten von *sigG* konnte in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 ermittelt werden. Darüber hinaus zeigten Gene des tricistronischen *sigF*-Operons (CA_C2306-2308), deren Verantwortung in der Kontrolle früher Sporulations-Ereignisse liegt (Tomas, Alsaker *et al.* 2003), eine signifikant verstärkte Expression in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3. Ein ähnliches Expressionsverhalten konnte für die Sporulationsgene *spoVD* (CA_C2130), *spoVE* (CA_C2126), *spoVG* (CA_C3223) und *spoVS* (CA_C1817) beobachtet werden.

Die Gene CA_C2306-2308, *spoVD*, *spoVE*, *spoVG* und *spoVS* zeigten unterdessen in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 keine erhöhten Expressionen. Die Expressionsdaten und Annotationen sind der Tabelle 7.12 im Anhang zu entnehmen.

Expression von Genen der Zellstabilität, der Zellteilung und des *Quorum sensing*

Die Zellstabilität einiger bakterieller Zellen wird durch eine proteinhaltige zweidimensionale parakristalline Schicht gewährleistet (*S-Layer*). Die Stabilität des *S-Layers* wird durch enthaltene Liposomen und einzelne Lipide unterstützt. Die Genomsequenzierung von *C. acetobutylicum* identifizierte ein putatives Operon mit enthaltenem Lipoprotein (CA_P0058) und putativen *S-Layer* Protein (CA_P0057). In den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnte für das Gen CA_P0057 eine signifikant erhöhte Induktion nachgewiesen werden, wohingegen CA_P0058 lediglich in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 eine verstärkte Expression zeigte.

Neben den Genen der Zellstabilität zeigten einige Gene der Zellteilung (*fts*) ein ähnliches Expressionsverhalten. Anhand von Studien in *Bacillus subtilis* konnte die essentielle Rolle des bicistronischen Operons *ftsZ/ftsA* (Tomas, Alsaker *et al.* 2003) und des *ftsK* Gens während der Zellteilung und Sporulation des Organismus verdeutlicht werden (Feucht, Lucet *et al.* 2001; Kemp, Driks *et al.* 2002). In *C. acetobutylicum* pDK3 zeigten die Gene *ftsA* (CA_C1692) und *ftsK* (CA_C1871) eine signifikant verstärkte Expression, wenngleich für die GTPase der Zellteilung (*ftsZ* CA_C1693) keine Änderung der Expression ermittelt werden konnte. Für die aufgezeigten Gene der Zellteilung konnten unterdessen in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 keine erhöhten Expressionen nachgewiesen werden.

Das *Quorum sensing* ist ein Mechanismus, bei dem bakterielle Populationen die Genexpression als Antwort auf die Zelldichte koordiniert kontrollieren (Fuqua, Winans *et al.* 1994). Mit Hilfe der Sequenzvergleiche via BLAST auf Aminosäureebene ließen sich homologe Bereiche in *C. acetobutylicum* zu dem *agr* Locus in *Staphylococcus aureus* nachweisen (Cooksley, Davis *et al.* 2010). Für die Gene des putativen *agr*-Operon (CA_C0078-CA_C0081; s. Abbildung 3.14) konnten im Zuge dieser Transkriptionsanalysen unterschiedliche Expressionsdaten ermittelt werden. Während die ORF's eines Genregulator-Proteins (*agrB*) und eines *Response*-Regulators (*agrA*) in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 eine zweifach-erhöhte Induktion aufwiesen, konnte für die Gene eines *Autoinducer* Peptids (*agrD*) und einer Histidin-Sensor Kinase (*agrC*) keine Expressionsänderung beobachtet werden. In den Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK2 zeigte

unterdessen lediglich das Gen *agrD* eine erhöhte Expression. Die Expressionsdaten und Annotationen sind der Tabelle 7.13 des Anhangs zu entnehmen.

Expression von Genen verschiedener Stressproteine (Hitzeschock-Proteine)

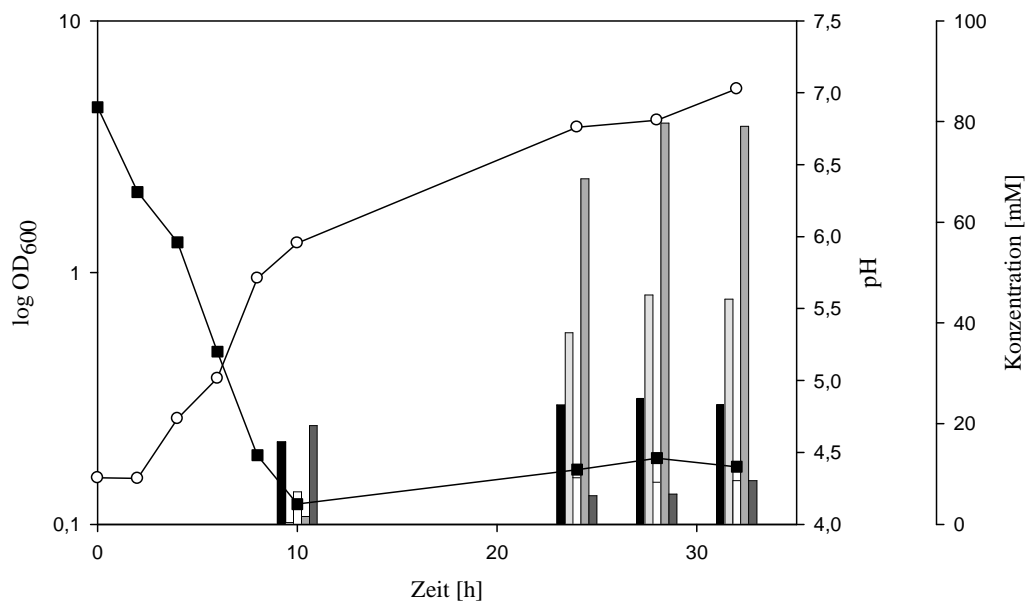
Hitzeschock-Proteine (HSP) oder molekulare Chaperone nehmen eine essentielle Rolle im Transport, der Synthese und der Faltung von Proteinen ein. Die Induktion dieser Stressproteine ermöglicht den Zellen das Überleben während verschiedener Umweltbelastungen (Morimoto, 1994). So induziert *C. acetobutylicum* bei steigender Butanol-Konzentration bekannte Stressproteine (Hitzeschock-Proteine HSP) (Terracciano and Kashket 1986). Die Stressproteine werden in einzelne Hauptfamilien unterteilt (*dnaKJ*, *hsp18*). Die *dnaKJ* (CA_C1280-CA_C1283) und *groESL* (CA_C2703-CA_C2704) Operon-Strukturen in *C. acetobutylicum* verfügen über die gleiche Organisation jener Strukturen in *B. subtilis*. Dabei werden beide Operon-Strukturen durch den Hitzeschock-Protein-Repressor HrcA negativ beeinflusst. Die Clp und Lon-Proteasen (*clpX*, *lonA*, CA_C0457) stellen weitere Schlüsselemente in der Stressantwort dar. In dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 und bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnten für all diese im oberen Abschnitt aufgeführten Stressproteine eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Für das homologe Gen *lonA* (CA_C2637) konnte indes keine Änderung der Expression beobachtet werden. Des Weiteren zeigten homologe *dnaK*- (CA_C0472-CA_C0473) und *grpE*-Gene (CA_C0471) sowie das *ctsR-yacH-yacI-clpC* Operon (CA_C3192-CA_C3189) eine ebenfalls signifikant erhöhte Transkription unter letztgenannter Bedingung.

Die Transkriptionsanalysen von *C. acetobutylicum* pDK3 zeigten unterdessen keine erhöhten Expressionsdaten dieser angeführten Stressproteine bei einer reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität. Die Expressionsdaten und Annotationen aller Gene sind in der Tabelle 7.14 des Anhangs zu finden.

3.1.6.2.1 Analyse der Fermentationsprodukte von *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 während des stationären Wachstums

Die transkriptionelle Untersuchung der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 gegenüber der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero bei stationären Wachstum lässt die Frage in den Vordergrund rücken, in wie weit die Fermentationsprodukte in Abhängigkeit der reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität beeinflusst werden würden. Des Weiteren galt es, die auf transkriptioneller Ebene erzielten Daten mit Hilfe biochemischer Analysen zu untermauern. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurde eine vergleichende Analyse der Fermentationsprodukte zu verschiedenen Zeitpunkten der stationären Wachstumsphase für die Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pSOSzero durchgeführt (s. Abbildung 3.23 A/B).

A



B

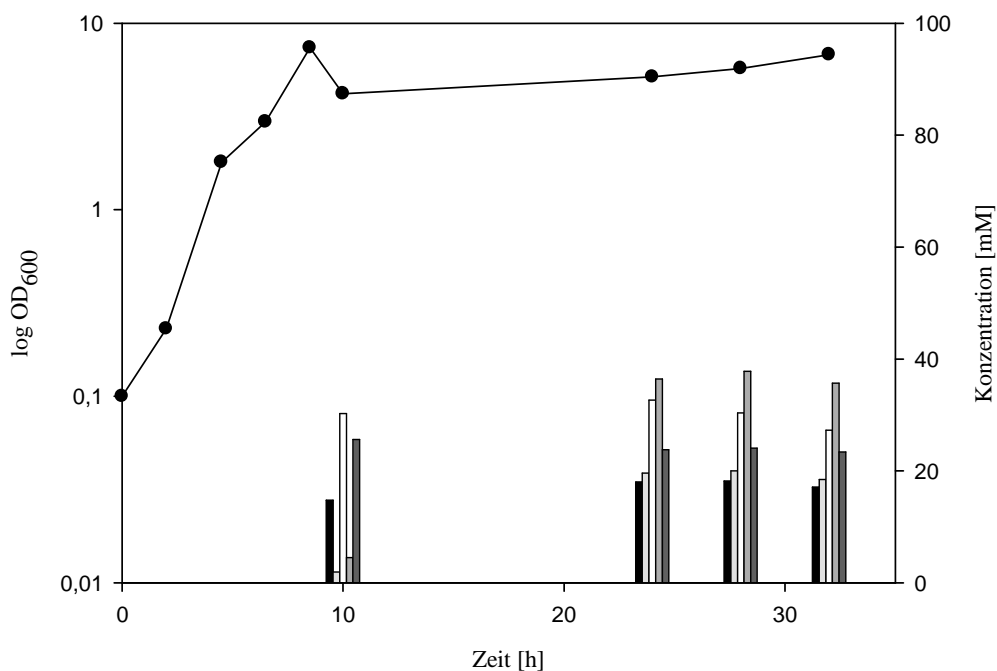


Abbildung 3.23: Vergleichende quantitative Analyse der Fermentationsprodukte von den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pSOSzero bei stationärem Wachstum. **A:** Dargestellt ist der Wachstumsverlauf (○) gegenüber der Abnahme des pH-Wertes (■) von dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2. **B:** Dargestellt ist der Wachstumsverlauf (●) der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero. Ausgehend von einer 100 ml CG-Medium mit Clarithromycin versehenen Batch-Kultur wurden die Fermentationsprodukte Ethanol (schwarzer Balken), Aceton (hellgrauer Balken), Acetat (weißer Balken), Butanol (mittelgrauer Balken) und Butyrat (dunkelgrauer Balken) zu angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine repräsentative Einzelmessung.

Das Hauptaugenmerk dieser quantitativen Analyse der Fermentationsprodukte richtete sich auf die transitions- bzw. stationäre Wachstumsphase der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pSOSzero. Mit Betrachtung der Abbildung 3.23 A/B konnten in Abhängigkeit reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität signifikante Unterschiede hinsichtlich der Menge der Fermentationsprodukte nachgewiesen werden.

Die während der Acidogenese angehäuften Säuren von 6,42 mM Acetat und 19,63 mM Butyrat konnten durch den Organismus teilweise reabsorbiert und für die Produktion der Lösemittel genutzt werden. Diese Theorie wird durch die Verringerung der Säuren-Konzentration von 8,64 mM Butyrat und der signifikanten Expression der Gene *ctfA/B* untermauert. Darüber hinaus konnte in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 eine Zunahme von 24,94 mM Ethanol-, 45,56 mM Aceton- und 79,69 mM Butanol-Konzentration im Vergleich zu der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero mit 18,22 mM Ethanol, 20,04 mM Aceton und 37,80 mM Butanol nach 28 h Wachstum beobachtet werden. Dieses Fermentationsverhalten geht mit der signifikanten Expression der Gene *adhE1*, *bdhA*, *bdhB* und *adc* einher.

Für eine vergleichende quantitative Analyse der Fermentationsprodukte von den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK3 und *C. acetobutylicum* pSOSzero wurden die Kulturüberstände zum Zeitpunkt der Zellernte (s. Abbildung 3.18 B), wie in 2.8.1 beschrieben, näher untersucht. In Abhängigkeit reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Menge der Fermentationsprodukte nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.24).

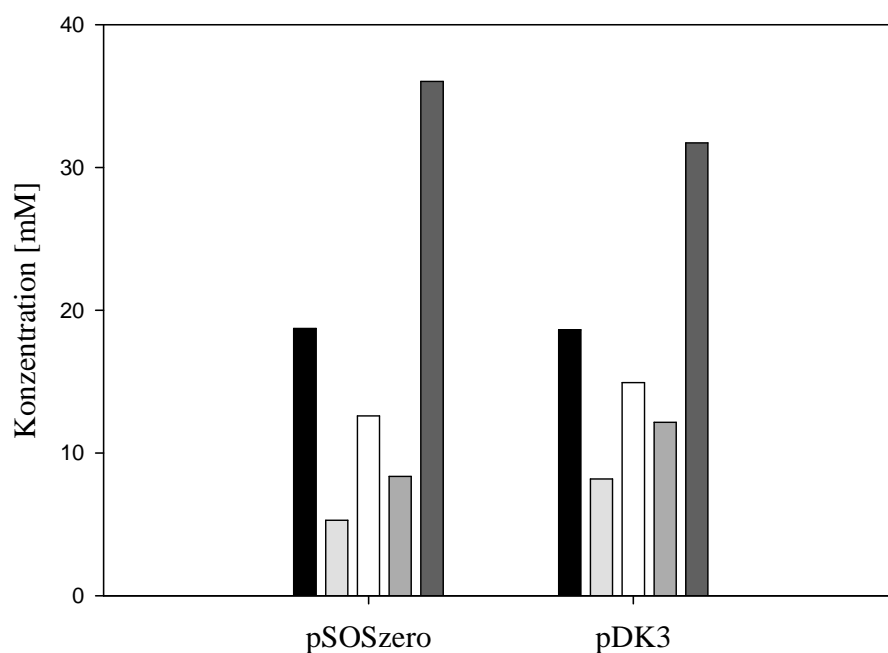


Abbildung 3.24: Quantitative Analyse der Fermentationsprodukte von *C. acetobutylicum* pDK3 und *C. acetobutylicum* pSOSzero bei stationärem Wachstum. Darstellt sind die Konzentrationen der Fermentationsprodukte Ethanol (schwarzer Balken), Aceton (hellgrauer Balken), Acetat (weißer Balken), Butanol (mittelgrauer Balken) und Butyrat (dunkelgrauer Balken) zum Zeitpunkt der Zellernte (s. Abbildung 3.18 B). Es handelt sich hierbei um eine repräsentative Einzelmessung.

Infolge der quantitativen Analyse der Fermentationsprodukte konnten vereinzelte Expressionsdaten verschiedener Gene des fermentativen Stoffwechsels verifiziert werden. Mit Betrachtung der Abbildung 3.24 wird die erhöhte Produktion der solventogenen Lösungsmittel von 8,17 mM Aceton und 12,14 mM Butanol durch den Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero mit 5,27 mM Aceton und 8,35 mM Butanol verdeutlicht. Diese biochemischen Daten korrelieren mit der erhöhten Expression der Gene *adc* und *bdhB* bei verminderter Hydrogenase HydA Aktivität (s. 3.1.6.2). Im Kontrast dazu ist die Produktion von Ethanol zu sehen. Für beide Stämme konnten vergleichbare Mengen des Lösungsmittels bestimmt werden. Dieses Fermentationsverhalten steht in Korrelation zu den Expressionsdaten des Gens *adhE1*, dessen Transkription sich unter den vorherrschenden Bedingungen nicht änderte. Infolge der vermehrten Produktion von Butanol durch den Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 wäre mit einer Minderung der Butyrat-Konzentration im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero zu rechnen. Tatsächlich

konnte eine geringere Butyrat-Konzentration in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 nachgewiesen werden. Jedoch steht dieses Fermentationsverhalten nicht im Zusammenhang mit den erzielten transkriptionellen Daten, da für das Gen *ctfB* eine erhöhte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero nachgewiesen werden konnte. Ein ähnliches Fermentations-Expressionsverhältnis konnte für die Acetat-Produktion beobachtet werden. Die erhöhte Acetat-Konzentration in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 korreliert nicht mit den Expressionsdaten der dafür verantwortlichen Gene (*pta*, *ackA*), da diese unter den vorherrschenden Bedingungen keine Expressionsänderungen aufzeigten. Jedoch deutet die gemessene Acetat-Konzentration darauf hin, dass weniger Acetat reassimiliert wird. Diese Theorie wiederum wird durch das nicht ändernde Expressionsverhalten von *ctfA* unterstützt.

Die Fermentations- und Transkriptionsanalysen deuteten auf eine schnellere Umsetzung des Substrats Glukose in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die Glukose-Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums dieser Stämme bestimmt.

3.1.6.2.2 Bestimmung der Glukose-Konzentration in Kulturen von *C. acetobutylicum* ATCC pDK2, *C. acetobutylicum* ATCC pDK3 und *C. acetobutylicum* pSOSzero während des stationären Wachstums

Für die quantitative Analyse der Glukose-Konzentration in Kulturen von *C. acetobutylicum* pDK2, *C. acetobutylicum* pDK3 und der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero wurden Kulturüberstände nach 24 h und 32 h Wachstum, wie unter 2.8.2 beschrieben, enzymatisch untersucht. Als Kontrolle diente reines CG-Medium. In Abhängigkeit der reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität konnten deutliche Unterschiede in Bezug auf die Glukose-Verwertung der Stämme detektiert werden (s. Abbildung 3.25).

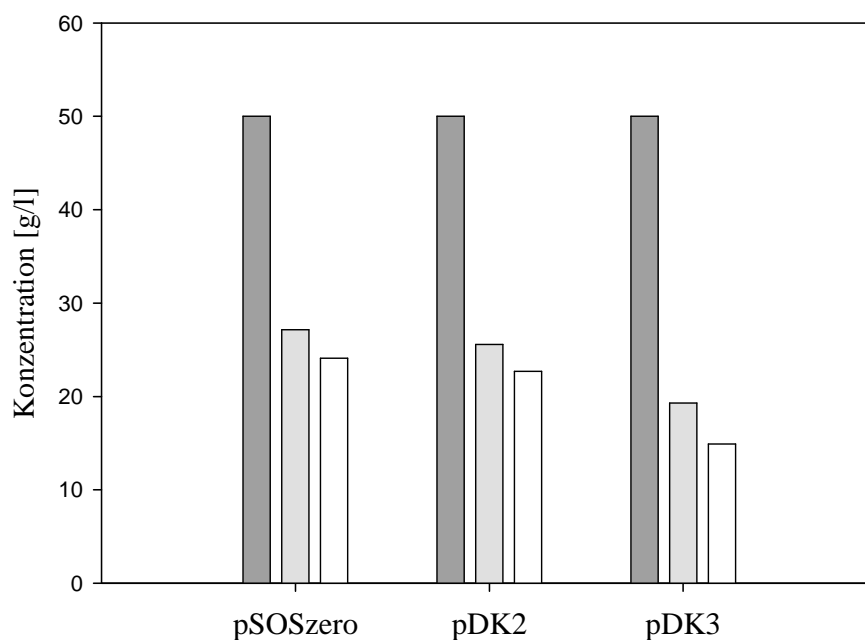


Abbildung 3.25: Quantitative Analyse der Glukose-Konzentration in Kulturen von *C. acetobutylicum* pSOSzero, *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Dargestellt sind die Glukose-Konzentrationen von reinem CG-Medium (grauer Balken) und von Kulturüberständen der Stämme nach 24 h (hellgrauer Balken) und 32 h (weißer Balken) Wachstum. Die enzymatische Messung jeder Probe wurde dreifach durchgeführt und der Mittelwert dargestellt. Erläuterung siehe Text.

Mit Betrachtung der Abbildung 3.25 wird ein unterschiedlicher Glukose-Verbrauch der aufgeführten Stämme ersichtlich. Während die Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero nach 24 h Wachstum eine Glukose-Konzentration von 27,17 g/l aufwies, konnte für die Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 mit 25,56 g/l und *C. acetobutylicum* pDK3 mit 19,31 g/l bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität zum gleichen Wachstumszeitpunkt ein höherer Glukose-Verbrauch nachgewiesen werden. Ein deutlicherer Unterschied hinsichtlich des Glukose-Verbrauches der dargestellten Stämme konnte nach 32 h Wachstum beobachtet werden. Für den Stamm mit der kleinsten Antisense-RNA Konstruktlänge *C. acetobutylicum* pDK3 konnte die geringste Glukose-Konzentration mit 14,91 g/l und demzufolge der größte Glukose-Verbrauch detektiert werden. Vergleichend dazu sind die ermittelten Glukose-Konzentrationen der Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 mit 22,69 g/l und *C. acetobutylicum* pSOSzero mit 24,1 g/l zu betrachten. Dieses Verhalten geht mit der signifikant verstärkten Expression verschiedener Zucker-spezifischer Transportsysteme bei verminderter Hydrogenase HydA Aktivität einher.

3.2 Untersuchung des Wachstumsverhalten von *C. acetobutylicum* in Anwesenheit verschiedener Wachstumsinhibitoren

Für die Etablierung von Methoden für *clean deletion* Systeme und der Transposon-Mutagenen ist die Verwendung verschiedener Selektions-Marker erforderlich. Sie fungieren als Marker bei Transformation und Rekombination, und ermöglichen das molekularbiologische Arbeiten. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die kleinste Wirkstoffkonzentration einer Substanz, die ein Bakterienwachstum verhindert. Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) verschiedener Substanzen in *C. acetobutylicum* wurden quantitative Verfahren auf Fest- bzw. in Flüssigmedien, wie unter 2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Hierbei erwies es sich als Vorteil den Wachstumsverlauf über eine Zeitspanne zu beobachten und minimale visuelle Veränderungen frühzeitig zu erkennen (Gould 2000). Für die Untersuchung biotechnologisch relevanter Gene in *C. acetobutylicum* ist die Etablierung von Methoden für *clean deletion* Systeme und Transposon-Mutagenesen und daraus resultierend die Verwendung von Antibiotika unabdingbar. Aus diesem Grund wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) einzelner Antibiotika (Kanamycin, Tetracyclin) und 5-Fluorouracil in *C. acetobutylicum* untersucht.

3.2.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von 5-Fluorouracil, Kanamycin und Tetracyclin in *C. acetobutylicum*

Das Fluorpyrimidin 5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Analogon der Nukleinbase Uracil. In *Bacillus subtilis* und *Enterococcus faecalis* konnte gezeigt werden, dass es erfolgreich bei der Gegenselektion zur Erstellung von Knock-out Mutanten eingesetzt werden kann (Fabret, Ehrlich *et al.* 2002; Kristich, Manias *et al.* 2005). Die Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) wandelt dabei, aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Uracil, den Antimetaboliten 5-Fluorouracil in das korrespondierende Monophosphat 5-Fluoro-UMP um. Die Anwesenheit des Monophosphats 5-Fluoro-UMP unterbindet die Funktion der Thymidylat-Synthase und inhibiert infolgedessen die Replikation der DNA. Ein Absterben der betroffenen Zelle wäre die Folge. Für die Etablierung eines markerfreien Deletionssystems in *C. acetobutylicum* wurde dessen Wachstumsverhalten in Anwesenheit des

Basenanalogs 5-Fluorouracil, wie unter 2.3.3 beschrieben, in Fest- und Flüssigmedium untersucht. Aufgrund einer konstanten Mutationsrate von 10^{-6} erfolgte die exakte Bestimmung der Zellzahl einer *C. acetobutylicum* Vorkultur mit Hilfe der Thoma-Zählkammer. Mit Hilfe der quantitativen Verfahren konnte eine MHK von 200 µg/ml 5-Fluorouracil gegenüber *C. acetobutylicum* in Fest- und Flüssigmedium ermittelt werden.

Für die Bestimmung der MHK von Kanamycin in *C. acetobutylicum* wurde ebenfalls dessen Wachstumsverhalten in Anwesenheit des Antibiotikums, wie unter 2.3.3 beschrieben, untersucht. Das quantitative Verfahren detektierte eine MHK von 100 µg/ml Kanamycin in Flüssigmedium.

Mit Hilfe der quantitativen Verfahren konnte das Wachstumsverhalten von *C. acetobutylicum* ATCC 824 in Abhängigkeit von Tetracyclin in Fest- und Flüssigmedium analysiert werden. Für Tetracyclin konnte eine MHK von 20 µg/ml unter beiden Bedingungen nachgewiesen werden.

Für eine übersichtliche Darstellung sind die MHKs in der Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6: Übersicht zu den minimalen Hemmkonzentrationen der untersuchten Selektions-Marker in *C. acetobutylicum*.

Selektions-Marker	minimale Hemmkonzentration [µg/ml]	
	Fest	Flüssig
5-Fluorouracil	200	200
Kanamycin	-	100
Tetracyclin	20	20

3.3 Etablierung eines markerfreien Deletionssystems in *C. acetobutylicum*

Für die Manipulation einzelner Gene oder größerer Genombereiche werden einfache Methoden benötigt. Eine Art der gerichteten Mutagenese stellt die markerfreie Deletion dar. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Erzeugung multipler Mutationen ohne die Insertion von Antibiotikaresistenzen. Eine Möglichkeit für die Etablierung von markerfreien Deletionen wird durch die kodierenden Genen der Phosphoribosyltransferasen (PRTasen) gewährleistet (Spring, Mattick *et al.* 1994;

Fukagawa, Hayward *et al.* 1999; Peck, DasSarma *et al.* 2000; Fabret, Ehrlich *et al.* 2002; Bitan-Banin, Ortenberg *et al.* 2003; Pritchett, Zhang *et al.* 2004; Kristich, Manias *et al.* 2005). Die PRTasen regenerieren freie purine oder pyrimidine Basen mit deren Umwandlung in ihre korrespondierenden Nukleotid-Monophosphate. Ungeachtet dessen können PRTasen Basenanaloga umsetzen, in dessen Folge toxische Nukleotideanaloga entstehen. Mutationen dieser kodierenden Gene unterbinden den toxischen Effekt und schaffen die Basis der Gegenselektion.

3.3.1 Die Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*)

Die Etablierung eines markerfreien Deletionssystems in *C. acetobutylicum* soll auf der Verwendung der Uracil-Phosphoribosyltransferase beruhen. Sie katalysiert die Umwandlung des Uracils in sein korrespondierendes Monophosphat (UMP), wodurch der Zelle die Verwendung von exogenem Uracil ermöglicht wird (Neuhard, 1983; Nygaard, 1993). Die Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase) kann das toxische Pyrimidinanalogon 5-Fluorouracil (5-FU) in sein korrespondierendes Monophosphat 5-Fluoro-UMP umsetzen. Mit der Synthese des 5-Fluoro-UMP entsteht 5-Fluoro-dUMP, ein wirksamer Inhibitor der Thymidylat Synthase (Neuhard, 1983). Infolge dessen wird die Funktion dieses Enzym unterbunden und die DNA-Replikation inhibiert. Für die Verwendung von 5-FU als Marker für die Gegenselektion ist jedoch eine Modifikation des Ausgangsstammes notwendig. Hierbei muss zunächst das *upp*-Gen von *C. acetobutylicum* durch doppelte homologe Rekombination mit den Deletionsvektoren deletiert werden.

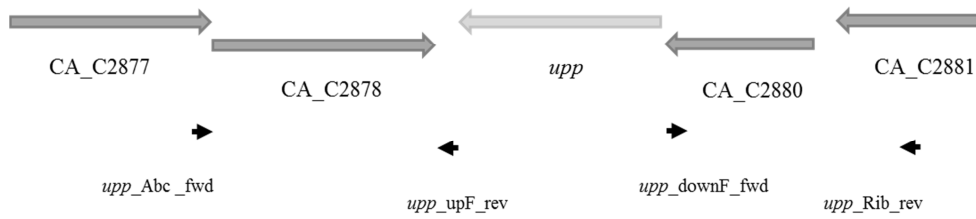
3.3.2 Konstruktion der Deletionsvektoren

Für die Deletion der Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) wurden zunächst flankierend homologe Bereiche außerhalb des zu deletierenden Gens festgelegt. Mit Hilfe der Oligonukleotid-Paare *upp_Abc_fwd/upp_upF_rev* und *upp_Rib_rev/upp_downF_fwd* erfolgte die Amplifikation der Flanken zur Erzeugung der Deletionskassette. Dabei wurden die Positionen der Oligonukleotide so gewählt, dass infolge der Deletion des *upp*-Gens keine neuen ORF`s entstehen. Die Größe erzeugten Flanken betrug 839 bp bzw. 915 bp. Während die Oligonukleotide *upp_Abc_fwd* und *upp_Rib_rev* Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Bam*HI

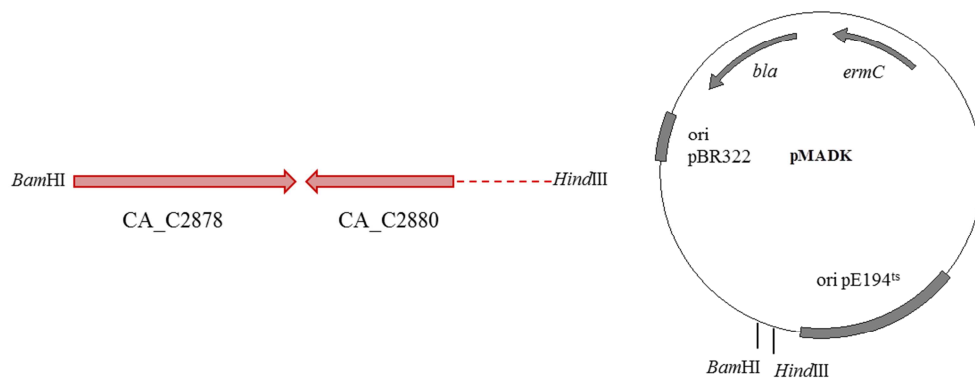
und *HindIII* generierten, verfügten die beiden inneren Oligonukleotide über revers komplementäre Sequenzen des jeweils Anderen. Die Fusion beider Flanken erfolgte via GeneSOEing (s. 2.6.3). Die erhaltene Deletionskassette (1714 bp) wurde nachfolgend mit den Restriktionsendonuklease *BamHI* und *HindIII* hydrolysiert. Um die Rekombinationseffizienz in *C. acetobutylicum* zu überprüfen, standen verschiedene Ausgangsvektoren mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen zur Verfügung (pMADK, pJIR750, pCH1). Nach deren Restriktion mit der Hilfe der Enzyme *BamHI* und *HindIII* erfolgte die Ligation der zuvor hydrolysierten Deletionskassette in die einzelnen Vektoren. Die konstruierten Deletionsvektoren wurden mit pMADK^{upp}-II, pDK15 und pDK16 bezeichnet und standen nach ihrer Überprüfung durch Sequenzierung für den Transfer und die homologe Rekombination in *C. acetobutylicum* zur Verfügung. Die Abbildung 3.26 fasst einzelne Schritte zur Konstruktion der Deletionsvektoren am Beispiel von pMADK zusammen.

Ergebnisse

A PCR-Amplifikation der flankierend homologen Bereiche des *upp*-Gens aus der genomischen DNA von *C. acetobutylicum* ATCC 824



B Restriktion der Deletionskassette und des Vektors pMADK mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III



C Ligation der Deletionskassette in den Vektor pMADK; Konstruktion des Deletionsvektors pMADK^{upp-II}

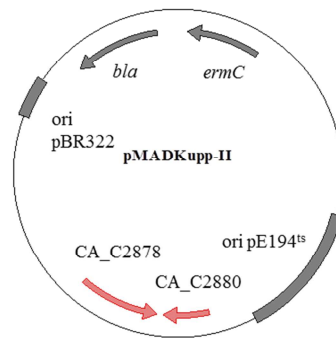


Abbildung 3.26: Konstruktion der Deletionsvektoren am Beispiel von pMADK zur Inaktivierung der Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) in *C. acetobutylicum*. *bla*: Ampicillin-Resistenzgen; *ermC*: Erythromycin-Resistenzgen; *ori*R pE194^{ts}: Temperatur-sensitiver Replikationsursprung; *ori* pBR322: Replikationsursprung; Deletionskassette des *upp*-Gens ist durch rote Pfeile mit einer gestrichelter Linie gekennzeichnet; Oligonukleotide sind als schwarze Pfeile dargestellt.

3.3.3 Deletion des *upp*-Gens in *C. acetobutylicum*

Für eine Elektroporation der Deletionsvektoren in *C. acetobutylicum* ist eine *in vitro* Methylierung der zu transferierenden DNA in *E. coli* ER2275 (pAN1) erforderlich. Die Elektroporation wurde wie unter 2.4.4.2 beschrieben, durchgeführt. Die erhaltenen Clarithromycin resistenten Klone wurden zunächst in ein Raster auf Selektivmedium (CG-Medium + Clarithromycin + 50 µM Thymidin) ausgestrichen, bevor sie auf das Vorhandensein des Vektors mittels PCR untersucht wurden (s. 2.6.1). Für die Integration der Deletionsvektoren in das Chromosom von *C. acetobutylicum* wurden positiv getestete Transformanten in je 5 ml CG-Medium mit Clarithromycin und 50 µM Thymidin angezogen. Darüber hinaus wurden in parallelen Experimenten auf die Verwendung von Clarithromycin im Medium verzichtet, die Kulturen mehrfach passagiert und zu unterschiedlichen Inkubationszeiten geerntet. Angesichts der Tatsache, dass zwei Integrationsmöglichkeiten der Vektoren in das Chromosomen bestehen, erfolgte der Nachweis der 1. Rekombination mit Hilfe verschiedener Oligonukleotidpaare (s. Abbildung 3.29 B 1+2) und zwei PCR-Ansätzen. Die Positionen der Oligonukleotide wurden so gewählt, dass die Integration des Vektors anhand eines Größenunterschiedes ersichtlich wird. Eine korrekte Integration über das down-Fragment (s. Abbildung 3.29 B1 CA_C2878) resultiert unter Verwendung der Oligonukleotide *upp_down_fwd* und *upp_down_rev* in einem 1159 bp großen PCR-Produkt, während bei nicht erfolgter Integration ein 1789 bp Fragment entsteht. Für die Integration der Vektoren über das up-Fragment (s. Abbildung 3.29 B2 CA_C2880) wurden die Oligonukleotide *upp_up_fwd* und *upp_up_rev* verwendet. Während bei Integration ein PCR-Produkt von lediglich 1005 bp amplifiziert wird, resultiert der Wildtyp-Zustand in einem 1635 bp Fragment. In Abhängigkeit verschiedener Inkubationszeiten und unter Verwendung von Clarithromycin konnte keine Integration des Deletionsvektors pDK16 in das Chromosomen von *C. acetobutylicum* nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.27).

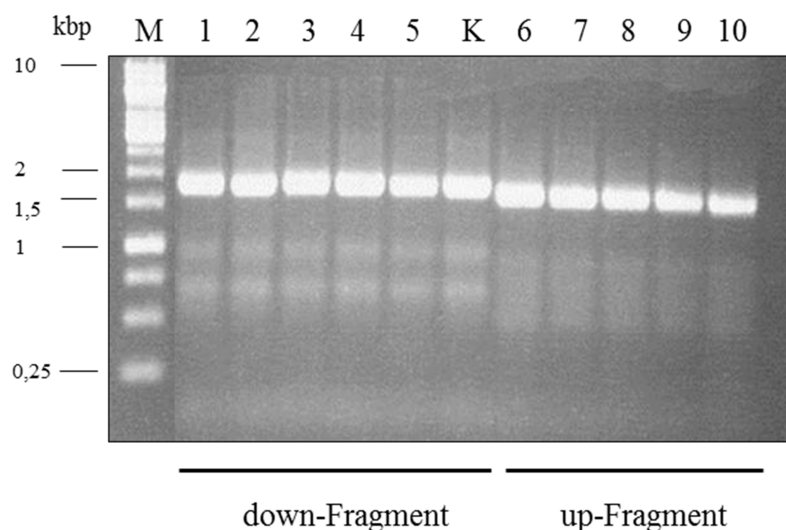


Abbildung 3.27: Integrationsversuch von pDK16 in das Chromosomen von *C. acetobutylicum*.

Untersucht wurden verschiedene Inkubationszeiten der Kultur unter Verwendung von Clarithromycin und 50 μ M Thymidin. Inkubationszeiten: 24 h (Spuren 1; 6); 48 h (2; 7); 120 h (3; 8); 144 h (4; 9); 192 h (5; 10). Genomische DNA von *C. acetobutylicum* diente als Kontrolle (K). M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Um die Rekombinationseffizienz verschiedener Deletionsvektoren (pMADK upp^- , pMADK upp^- II, pDK15, pDK17) zu untersuchen und mögliche Interaktionen zwischen Replikationsursprüngen eines Vektors im Chromosomen auszuschließen (oriR pE194^{ts}), erfolgte die Überprüfung möglicher Integrianten wie unter 2.6.1 beschrieben. Trotz verschiedener Vektorgrößen, Replikationsursprüngen und Orientierungen der Deletionskassette (pMADK upp^-) konnte keine Integration der Vektoren in *C. acetobutylicum* nachgewiesen werden. Zudem zeigten die Deletion des oriR pE194^{ts} sowie die Integration von *recA* (CA_C1815) mit seinem nativen Promotor in den Deletionsvektor pDK16 keine Wirkung. Für eine direkte Selektion auf das 2. Rekombinationsereignis wurden positiv getestete Clarithromycin resistente Klone in je 5 ml CG-Medium mit 50 μ M Thymidin angezogen und zu unterschiedlichen Inkubationszeiten auf das Selektivmedium CGM + 5-FU + 50 μ M Thymidin ausplattiert. Die erhaltenen 5-FU resistenten Klone wurden unter Verwendung der Oligonukleotide check Δupp_fwd und check Δupp_rev via PCR (s. 2.4.2.2 u. 2.6.1) auf die Deletion des *upp*-Gens untersucht. Die Positionen der Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass anhand eines Größenvergleiches zwischen Wildtyp (991 bp) und Mutante (361 bp) unterschieden werden konnte (s. Abbildung 3.29 C). Die direkte Selektion auf die Deletion des *upp*-Gens unter

Verwendung des toxischen Pyrimidinanalogon 5-FU resultierte infolge der PCR in der Amplifikation des Wildtyp-Zustandes (s. Abbildung 3.28).

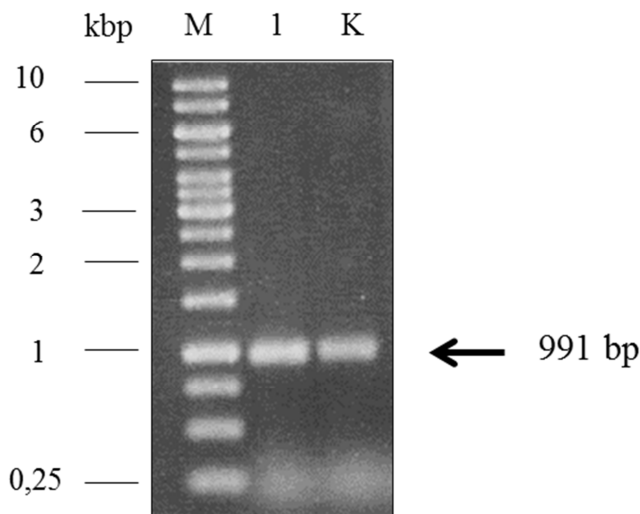


Abbildung 3.28: Untersuchung auf Inaktivierung des *upp*-Gens in *C. acetobutylicum*. Untersucht wurden 5-FU resistente Klone. An die Präparation der genomischen DNA (2.4.2.2) schloss sich die Überprüfung via PCR an. Der 5-FU resistente Klon (1) sowie die endogene Kontrolle (K: chr. DNA) detektierten mit 991 bp den Wildtyp-Zustand. M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

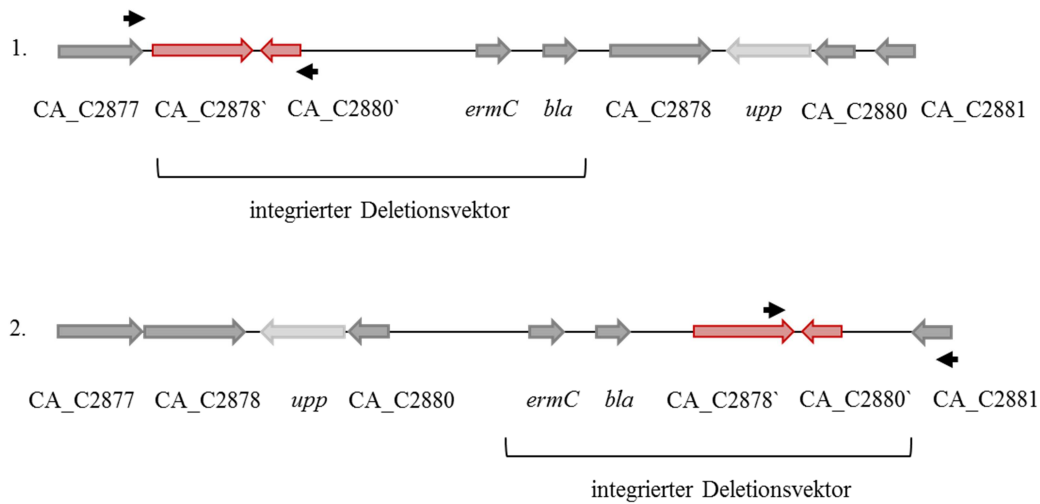
Die molekular-biologischen Daten deuten auf eine Problematik in Bezug auf die Rekombination homologer Bereiche in das Chromosomen von *C. acetobutylicum* hin. Ohne die Deletion *upp*-Gens gestaltet sich die Verwendung des toxischen Pyrimidinanalogon 5-FU als Marker für die Gegenselektion als schwierig. Abbildung 3.29 fasst die Rekombinationsereignisse und die Positionen der Oligonukleotide zusammen.

Ergebnisse

A Chromosomale Orientierung des *upp*-Gens in *C. acetobutylicum* ATCC 824



B Chromosomale Integration des Deletionsvektors pMADK*upp*-II in *C. acetobutylicum* ATCC 824



C Die beiden resultierenden Möglichkeiten der chromosomalen Anordnung in *C. acetobutylicum* ATCC 824 nach der 2. homologen Rekombination

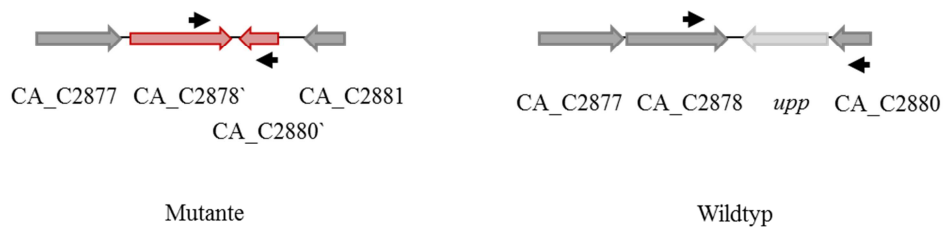


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse zur Inaktivierung der Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) in *C. acetobutylicum* ATCC 824 am Beispiel von pMADK*upp*-II. CA_C2828` CA_C2880` (rote Pfeile): Deletionskassette; *ermC*: Erythromycin-Resistenzgen; *bla*: Ampicillin-Resistenzgen; Oligonukleotide sind als schwarze Pfeile dargestellt.

3.4 Untersuchung der Temperatursensitivität am Beispiel des Vektors pKVM1

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung markerfreier Deletionen basiert auf der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} (Arnaud, Chastanet *et al.* 2004). Die Temperatursensitivität des Replikationsursprunges geht dabei auf eine mutagenisierte Form des Vektors pE194 zurück (Villafane, Bechhofer *et al.* 1987). Während bei Temperaturen unter 37°C eine stabile Replikation des Vektors sichergestellt ist, wird diese bei nicht-permissiven Temperaturen (37°C, 42°C) unterbunden.

Das Deletionssystem wurde ursprünglich durch Michael Rachinger, 2010 für *Bacillus licheniformis* etabliert. In dieser Arbeit sollte Herr Christopher Huptas unter meiner Anleitung untersuchen, ob dieses Deletionssystem auch auf *C. acetobutylicum* anwendbar ist.

3.4.1 Wachstum von *C. acetobutylicum* unter nicht-permissiven Temperaturen

Für die Überprüfung des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} (Arnaud, Chastanet *et al.* 2004) hinsichtlich seiner Temperatursensitivität in *C. acetobutylicum* wurde der Organismus mit dem Vektor pKVM1 elektroporiert (s. 2.4.4.2).

Nach erfolgreicher Elektroporation (s. 2.4.4.2) wurde *C. acetobutylicum* mit dem Vektor pKVM1 in 8 ml 2x YTG Medium unter Verwendung von Clarithromycin angezogen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 180 U/min auf dem Rotationsschüttler. Die Vorkultur diente der Inokulation zweier mit je 100 ml 2x YTG-Medium gefüllten Anaeroben-Flaschen. Für die Untersuchung der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} wurden Inkubationstemperaturen von 37°C und 42°C gewählt. Die Inkubation der Anaeroben-Flaschen erfolgte bei entsprechend gewählten Temperaturen und 180 U/min auf dem Rotationsschüttler. Ausgehend von der Inokulationszeit wurden alle 2 Stunden Proben entnommen, die zum einen der Bestimmung der optischen Dichte (600 nm) und zum anderen dem Anfertigen einer Verdünnungsreihe galten. Im weiteren Verlauf wurden ausgewählte Verdünnungen beider Temperaturen zu den jeweiligen Zeitpunkten (nach 2-10 Stunden und nach 23 Stunden) auf CGM-Platten

mit und ohne Selektionsdruck ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C für circa 60 Stunden. Unter Verwendung von CGM-Platten ohne Selektionsdruck konnte die Gesamtzellzahl/ml detektiert werden. Die auf CGM-Platten mit Clarithromycin gewachsenen Kolonien bestimmten die Zahl enthaltender pKVM1 Zellen/ml. Um den Fehler zur Bestimmung der Gesamtzellzahl/ml und der Zahl enthaltender pKVM1 Zellen/ml zu minimieren, wurden zu jedem Zeitpunkt drei Platten mit unterschiedlichen Verdünnungen ausgezählt. Dadurch konnte der prozentuale Anteil pKVM1 enthaltener Zellen/ml in Relation zur Gesamtzellzahl/ml für jeden Probenzeitpunkt bei entsprechender Temperatur detektiert werden.

In Abhängigkeit der Inkubationstemperaturen (37°C, 42°C) konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges in *C. acetobutylicum* nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.30).

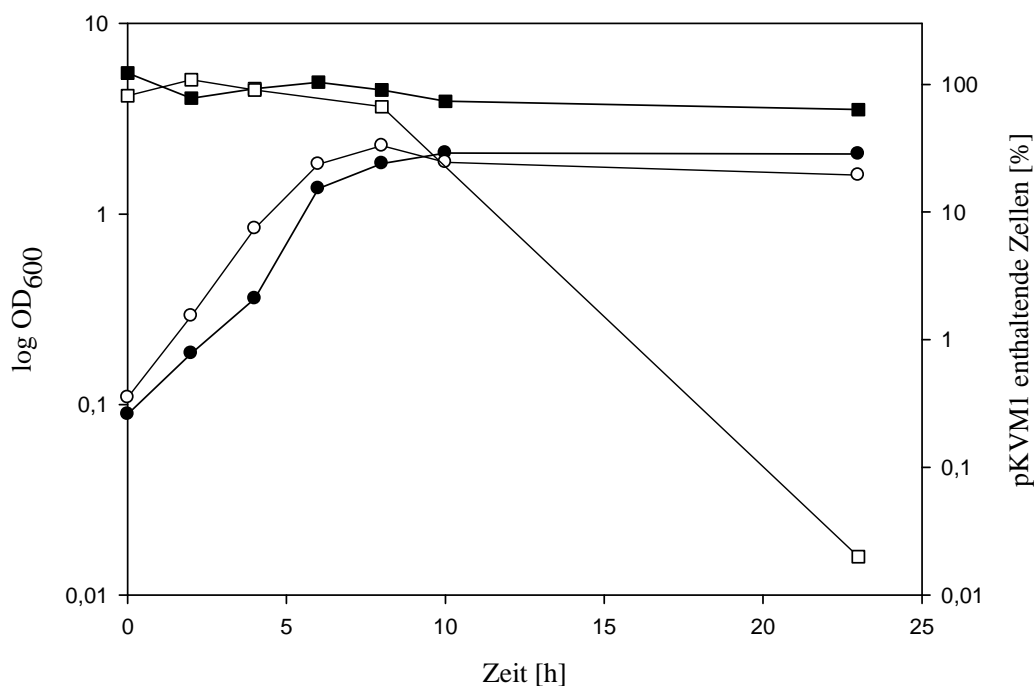


Abbildung 3.30: Untersuchung der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} in *C. acetobutylicum* am Beispiel von pKVM1. Darstellt sind die Wachstumsverläufe des Organismus in Anwesenheit von pKVM1 bei 37°C (●) und 42°C (○) sowie der Anteil an Zellen mit Plasmid unter gleichen Bedingungen (37°C: ■; 42°C: □).

Mit Betrachtung der Abbildung 3.30 wird die Temperatursensitivität des Replikationsursprunges in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur in *C. acetobutylicum* verdeutlicht. Dabei konnten nur marginale Unterschiede in Bezug

auf den Temperatur-abhängigen Wachstumsverlauf des Organismus beobachtet werden (max. OD₆₀₀ 42°C: 2,28; max. OD₆₀₀ 37°C: 2,09). Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C verblieb der prozentuale Anteil pKVM1 enthaltender Zellen/ml in Relation zur Gesamtzellzahl/ml nahezu konstant. Prozentuale Werte oberhalb der 100 % (t₀: 122,97 %) deuten darauf hin, dass jede Zelle den Vektor pKVM1 enthält. Folglich wurde die Replikation des Vektors unter diesen Bedingungen nicht signifikant beeinflusst. In Kontrast dazu ist das Replikationsverhalten von pKVM1 in *C. acetobutylicum* während einer Inkubationstemperatur von 42°C zu sehen. Der prozentuale Anteil pKVM1 enthaltender Zellen/ml in Relation zur Gesamtzellzahl/ml verringerte sich während des Wachstumsverlaufes deutlich. Während der Vektor pKVM1 nach 8 h in 66,85 % der Zellen enthalten war, konnte nach 23 h das Plasmid in keiner der Zellen nachgewiesen werden (0,02 %). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Replikation des Vektors pKVM1 in *C. acetobutylicum* während des Wachstums bei 42°C inhibiert wird. Folglich könnte bei der nicht-permissive Temperatur auf chromosomale Integration oder den Verlust des Vektors selektiert werden.

3.4.2 Temperatursensitivität im Vergleich: *B. licheniformis* MW3 vs. *C. acetobutylicum*

Da ein markerfreies Deletionssystem, beruhend auf der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} (Arnaud, Chastanet *et al.* 2004), bereits in *B. licheniformis* etabliert worden war, sollte die Temperatursensitivität von *B. licheniformis* mit der bei *C. acetobutylicum* beobachteten, verglichen werden. Hierfür wurde der Vektor pKVM1 durch ein diparentalen Matings in *B. licheniformis* MW3 konjugiert (s. 2.4.4.3). Für die Anzucht der Hauptkultur von *B. licheniformis* MW3 mit dem Vektor pKVM1 dienten 100 ml LSLB-Medium. Die Temperatursensitivität des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} wurde bei Inkubationstemperaturen von 30°C, 37°C und 42°C auf dem Rotationsschüttler (180 U/min) untersucht. Ausgehend von der Inokulationszeit wurde jede Stunde eine Probe zur Bestimmung der optischen Dichte (600 nm) und jede zweite Stunde eine Probe zur Anfertigung einer Verdünnungsreihe entnommen. Im weiteren Verlauf wurden ausgewählte Verdünnungen zu den jeweiligen Zeitpunkten (nach 1, 3, 5, 7, 9 h und nach 23 h) auf LSLB-Platten bzw. LSLB-Platten mit Erythromycin

ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht. Mit Hilfe der LSLB-Platten konnte die Gesamtzellzahl/ml detektiert werden. Die auf LSLB-Platten mit Erythromycin gewachsenen Kolonien bestimmten die Zahl enthaltender pKVM1 Zellen/ml. Um den Fehler zur Bestimmung der Gesamtzellzahl/ml und der Zahl enthaltender pKVM1 Zellen/ml zu minimieren, wurden zu jedem Zeitpunkt drei Platten mit unterschiedlichen Verdünnungen ausgezählt. Dadurch konnte der prozentuale Anteil pKVM1 enthaltener Zellen/ml in Relation zur Gesamtzellzahl/ml für jeden Probenzeitpunkt bei entsprechender Temperatur bestimmt und ein Vergleich zu *C. acetobutylicum* gezogen werden.

In Abhängigkeit der Temperaturen konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Replikationsverhaltens von pKVM1 zwischen den Stämmen *B. licheniformis* MW3 und *C. acetobutylicum* beobachtet werden (s. Abbildung 3.31).

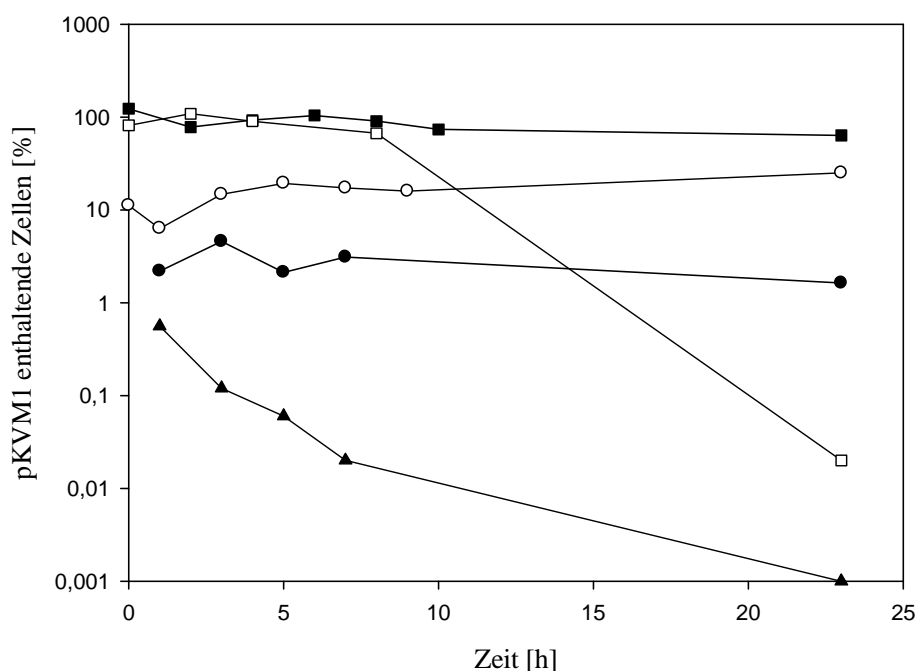


Abbildung 3.31: Temperatursensitivität des Replikationsursprunges oriR pE194^{ts} in *B. licheniformis* MW3 und *C. acetobutylicum* am Beispiel von pKVM1. Darstellt ist der Anteil Plasmid enthaltender Zellen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen von *B. licheniformis* MW3 (30°C: ●; 37°C: ○; 42°C: ▲) und *C. acetobutylicum* (37°C: ■; 42°C: □).

Anhand der Abbildung 3.31 werden diese in Bezug auf das Replikationsverhalten des Vektors pKVM1 unter den gewählten Inkubationstemperaturen zwischen den Stämmen *B. licheniformis* MW3 und *C. acetobutylicum* verdeutlicht. Während die prozentualen Anteile pKVM1 enthaltender Zellen/ml in Relation zur

Gesamtzellzahl/ml bei Temperaturen von 30°C und 37°C in beiden Stämmen nahezu konstant blieben, beeinflusste die Inkubationstemperatur von 42°C das Replikationsverhalten des Vektors signifikant. Bei genauerer Betrachtung wird indes der geringere Anteil pKVM1 enthaltender Zellen während des Wachstums bei 30°C und 37°C in *B. licheniformis* MW3 verglichen mit *C. acetobutylicum* (37°C) sichtbar. Dennoch konnte keine signifikante Verringerung pKVM1 enthaltender Zellen in beiden Stämmen beobachtet werden. Folglich wurde eine stabile Replikation des Vektors in beiden Stämmen während des Wachstums bei 30°C und 37°C gewährleistet. Demgegenüber ist das Replikationsverhalten des Vektors bei einem Wachstum beider Stämme bei 42°C zu sehen. Nach 7 h (*B. licheniformis* MW3) bzw. 10 h (*C. acetobutylicum*) Wachstum war eine signifikante Reduzierung pKVM1 enthaltender Zellen zu beobachten. In beiden Stämmen konnten nach 23 h Wachstum keine pKVM1 enthaltende Zellen nachgewiesen werden. Daher inhibiert eine Temperatur von 42°C die Replikation des Vektors pKVM1 in beiden Stämmen in gleicher Weise.

4. Diskussion

4.1 Verminderung der H₂-Produktion durch eine reduzierte Hydrogenase HydA Menge

Clostridium acetobutylicum generiert seine Energie, wie eine Vielzahl anderer Clostridien, über Substratketten-Phosphorylierung. Dem Bakterium fehlt die Fähigkeit, seine Elektronen über eine Membran-gebundene Elektronentransportkette auf terminale Elektronenakzeptoren (Nitrat, Sulfat, Sauerstoff) zu übertragen. Die Produktion von Wasserstoff und den reduzierten Endprodukten Butanol, Ethanol und Laktat ermöglichen dem Organismus indes den Verbrauch der reduzierten Elektronenträger wie reduziertem Ferredoxin und NADH. Jedoch wird mit der Produktion der reduzierten Endprodukte der Kohlenstoff-Fluss durch Acetyl- bzw. Butyryl-Phosphat vermindert und folglich weniger Energie in Form von ATP gewonnen. Für die Optimierung seiner Energieproduktion durch die Substratketten-Phosphorylierung ist *C. acetobutylicum* bemüht, ein Großteil seiner Reduktionsäquivalente über reduziertes Ferredoxin in Form von Wasserstoff zu entfernen. Die Hydrogenase HydA scheint dabei eine zentrale Rolle in der H₂-Produktion von *C. acetobutylicum* innezuhaben. Untersuchungen zeigten, dass das Ferredoxin-abhängige HydA über eine 9-fach höhere Aktivität im Vergleich zu der [FeFe]-Hydrogenase HydB verfügt (Gorwa, Croux *et al.* 1996; King, Posewitz *et al.* 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Antisense-RNA Technologie die Enzymmenge der Hydrogenase HydA auf Translationsebene unter Verwendung verschiedener Antisense-RNA Konstrukte reduziert. Erste Hinweise darauf lieferten die durchgeführten Northern-Blot Analysen. Die Transkription der Antisense-RNA Konstrukte schien die Bildung von RNA-RNA-Komplexen zu verursachen und folglich die Translation der Hydrogenase HydA zu reduzieren. Es ist daher anzunehmen, dass durch Hybridisierung von mRNA und asRNA die Proteinmenge der Hydrogenase HydA entscheidend reduziert wurde. Diese Vermutung steht im Einklang mit den Beobachtungen von Nakayama *et al.* (2008). Sie zeigten, dass mit der Transkription der Antisense-RNA von *hupC* die Menge der H₂-uptake Hydrogenase HupCBA deutlich vermindert wurde (Nakayama, Kosaka *et al.* 2008).

Die Antisense-RNA Technologie ist eine zielgerichtete Methode um die Proteinmenge auf Translationsebene entscheidend zu reduzieren und folglich die Enzymaktivität zu beeinflussen (Janssen, Jones *et al.* 1990; Desai and Papoutsakis 1999; Perret, Maamar *et al.* 2004; Scotcher, Rudolph *et al.* 2005). Die Autoren um Desai *et al.* liefern erste Hinweise darauf, dass die Proteinmenge ausschlaggebend für die Aktivität des Enzyms ist. Die Phosphotransbutyrylase (Ptb) und die Butyrat-Kinase (Bk) zeigten infolge der Repression ihrer Translation eine deutlich verminderte Aktivität (Desai and Papoutsakis 1999). Es ist demnach anzunehmen, dass eine reduzierte Hydrogenase HydA Menge die Aktivität dieses H₂-produzierenden Enzyms deutlich herabsetzt. Die Hydrogenase HydA Aktivitäten in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 korrelieren in der Tat mit den Beobachtungen von Desai *et al.* Die Reduktion der HydA Menge infolge der Repression auf Translationsebene verringerte die Aktivität der Hydrogenase im Vergleich zu der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero um 51 % bzw. 40 %. Dagegen schien die Aktivität der Hydrogenase HydA in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK1 nicht beeinflusst zu werden. Eine Erklärung, warum die Aktivität der Hydrogenase in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK1 lediglich um 18 % im Vergleich zu der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero reduziert war, scheint das Verhältnis von ausgeprägten doppelsträngigen Stamm-Strukturen zu freien Nukleotiden in der Sekundärstruktur der asRNA zu sein. Das Verhältnis beschreibt das Maß für die Anzahl freier Nukleotide, die mit der komplementären mRNA interagieren können (Tummala, Junne *et al.* 2003). Während bei einem niedrigen Verhältnis, bezogen auf 100 Nukleotide der RNA, die Translation am stärksten inhibiert wird, umschreibt ein hohes Verhältnis einen geringen Einfluss auf die Translationseffizienz (Tummala, Welker *et al.* 2003). Folglich ist davon auszugehen, dass das Antisense-RNA Konstrukt in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK1 über eine ausgeprägte Anzahl doppelsträngiger Stamm-Strukturen verfügt und dadurch die Translation der Hydrogenase HydA nicht entscheidend inhibiert wird. Die Enzymmenge der Hydrogenase würde nachhaltig nicht wesentlich beeinflusst werden. Diese Theorie wird durch die geringe Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität (um 18 %) in *C. acetobutylicum* pDK1 im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero unterstützt. Darüber hinaus scheinen die Verhältnisse von ausgeprägten doppelsträngigen Stamm-Strukturen zu freien Nukleotiden in der Sekundärstruktur der asRNA in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und

C. acetobutylicum pDK3 relativ niedrig zu sein. Dafür sprechen die signifikanten Reduktionen der Hydrogenase HydA Aktivitäten, die in Folge der Komplementarität zwischen asRNA und mRNA der Hydrogenase und der daraus resultierenden Inhibition der Translation entstanden sind.

Die Aktivitäten der Hydrogenase HydB (King, Posewitz *et al.* 2006) und einer [NiFe]-Hydrogenase (Nölling, Breton *et al.* 2001) sind für Bestimmung der Hydrogenase HydA Aktivität augenscheinlich nicht relevant, da in den Transkriptionsanalysen während der logarithmischen Wachstumsphase keine Expressionen ihrer Gene nachgewiesen werden konnten.

Die Hydrogenase HydA Aktivität wird von der Proteinmenge dieses H₂-produzierenden Enzyms bestimmt. Mit dieser Erkenntnis drängte sich die Frage auf, welchen Einfluss eine reduzierte Hydrogenase HydA Aktivität auf die H₂-Produktion von *C. acetobutylicum* ausübt.

Für die Untersuchung dieser Fragestellung werden die biochemischen Daten der quantitativen Analyse der H₂-Produktion in den Stämmen mit enthaltenden Antisense-RNA Konstrukten näher beleuchtet. In den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 konnte eine Reduktion der H₂-Produktion pro Stunde um den Faktor von 1,4 im Vergleich zu der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero nachgewiesen werden. Es scheint, als würde mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität die H₂-Produktion des Organismus entscheidend herabgesetzt werden.

Die Beobachtungen von Kim *et al.* (1984) korrelieren mit dieser Annahme. Mit der CO-Begasung einer *C. acetobutylicum* Kultur verminderten sie die *in vivo* Hydrogenase Aktivität bis zu 65 % und verursachten folglich einen rapiden Abfall der H₂-Produktion (Kim, Bellows *et al.* 1984). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen in Anwesenheit von Neutral-Rot, einem artifiziellen Elektronenträger, eine 83 %-ige Reduktion der *in vivo* Hydrogenase Aktivität und daraus resultierend der H₂-Produktion (Girbal, 1995). Ähnliche Beobachtungen konnten unter erhöhten H₂-Partialdrücken (Doremus, Linden *et al.* 1985), unter Eisenlimitierenden Bedingungen (Bahl, Gottwald *et al.* 1986) (Junelles, 1988; Klein, 2009) und in Anwesenheit von Methylviologen (Rao and Mutharasan 1987; Peguin and Soucaille 1995; Peguin and Soucaille 1996) getroffen werden. Jedoch handelt es sich bei diesen Formen der Enzym-Inaktivierung um unspezifische Veränderungen

des Stoffwechsels, die auch andere Enzyme im Zusammenhang mit der H₂-Produktion beeinflussen könnten. Aus diesem Grund sind sie kein eindeutiger Beleg für eine Reduktion der H₂-Produktion durch eine verminderte Hydrogenase Aktivität. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Gene einer [FeFe]-Hydrogenase HydB und einer H₂-oxidierenden [NiFe]-Hydrogenase (*mbhL*, *mbhS*) in den durchgeführten Transkriptionsanalysen keine Expressionen zeigten, wird die zentrale Rolle der Hydrogenase HydA für die Produktion von molekularem Wasserstoff in *C. acetobutylicum* untermauert. Diese Erkenntnisse korrelieren mit den Untersuchungen von King *et al.* Die Hydrogenase HydA ist das wichtigste Enzym für die H₂-Produktion in *C. acetobutylicum* (King, Posewitz *et al.* 2006).

4.2 Hydrogenase HydA – Schlüsselenzym für die Produktselektivität?

Im Verlauf der Acidogenese generiert *C. acetobutylicum* seine Energie über die Substratketten-Phosphorylierung. Die angehäuften Reduktionsäquivalente wie reduziertes Ferredoxin werden in Form von molekularem H₂ entfernt und dadurch regeneriert. Mit dem *shift* in die Solventogenese verringert sich die Aktivität der Hydrogenase HydA (Gorwa, Croux *et al.* 1996) und der Verbrauch der Reduktionsäquivalente wird mit der Produktion von reduzierten Lösungsmitteln wie Butanol, Ethanol und Laktat gewährleistet. Aus diesem Grund besteht zwischen der Produktion von Wasserstoff und den reduzierten Endprodukten ein Konkurrenz-Verhältnis um den Elektronenfluss.

In solventogenen Chemostaten Kulturen konnte nach Gorwa *et al.* eine deutlich verminderte Hydrogenase HydA Aktivität im Vergleich zu acidogenen Chemostaten Kulturen nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität infolge der Antisense-RNA Technologie die Solventogenese in *C. acetobutylicum* vorzeitig induziert wird. Der Elektronenfluss würde sich auf Kosten der H₂-Produktion in Richtung der Lösungsmittel-Produktion verschieben. In der Tat konnte in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 mit reduzierter H₂-Produktion eine signifikante Steigerung der Lösungsmittel Butanol, Ethanol und Aceton nachgewiesen werden. Die Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität scheint eine verminderte Protonenaufnahme (Alkalisierung) im Cytoplasma hervorzurufen (Girbal, Vasconcelos *et al.* 1994) und reduziertes Ferredoxin anzuhäufen. Es stellt

sich jedoch die Frage, wie reduziertes Ferredoxin die NADH-abhängigen Reaktionen der Solventogenese begünstigen kann.

Ein Erklärungsansatz für die Steigerung des NADH-Gehaltes der Zelle durch reduziertes Ferredoxin könnte die Ferredoxin-NAD⁺-Reduktase liefern. Das Enzym, dessen Gen bislang noch nicht identifiziert wurde, kann nach Vasconcelos, Girbal *et al.* (1994) die Reduktion von NAD⁺ durch reduziertes Ferredoxin katalysieren und so den NADH-Gehalt der Zelle steigern (Vasconcelos, Girbal *et al.* 1994). Diese Reaktion ist jedoch diskussionswürdig, da sie in ineffizienter Energieverwertung verbunden mit einer unvorteilhaften Ansammlung von NADH resultiert.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Steigerung des NADH-Gehaltes durch angehäuften reduziertes Ferredoxin scheint die FAD/FMN-enthaltende Dehydrogenase mit den α - und β -Untereinheiten eines Elektronen-übertragenden Flavoproteins (CA_C2542-CA_C2544) zu sein. Es wäre denkbar, dass das reduzierte Ferredoxin mit einem Regulationssystem interagiert, welches die Expression der Dehydrogenase an das NADH/NAD⁺-Verhältnis der Zelle anpasst. Je nach Verfügbarkeit an reduziertem Ferredoxin würde die Reduktion von NAD⁺ mit der Hilfe der FAD/FMN-enthaltende Dehydrogenase und den EtfAB Komponenten (CA_C2542-CA_C2544) erfolgen. Als Folge dessen nimmt der NADH-Gehalt der Zelle zu und NADH-abhängige Reaktionen der Solventogenese können begünstigt werden.

In *Streptomyces coelicolor* und *Bacillus subtilis* konnte ein solcher globaler Regulator identifiziert werden. Der Repressor Rex passt die Expression der Dehydrogenasen an das NADH/NAD⁺-Verhältnis der Zelle an und reguliert so u.a. die Expression der fermentativen Laktat-Dehydrogenase (Brekasis and Paget 2003; Larsson, Rogstam *et al.* 2005). Über das Vorhandensein eines homologen Rex-Proteins in *C. acetobutylicum* ist jedoch bis dato noch nichts veröffentlicht.

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Expression von *adhE1* von dem NADH/NAD⁺-Gehalt der Zelle abhängt (Leonardo, Cunningham *et al.* 1993). Auch in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 konnte eine signifikant verstärkte Expression von *adhE1* nachgewiesen werden. Dieses Transkriptionsverhalten unter einer erhöhten NADH-Verfügbarkeit korreliert mit der Steigerung der Ethanol-Konzentration in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 um bis zu 21 %. Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten NADH-Verfügbarkeit und der Steigerung der Lösungsmittel-Produktion

wird durch Girbal *et al.* untermauert. In Anwesenheit von Neutral-Rot beobachteten sie eine Aktivitätszunahme aller NADH-abhängigen Enzyme, die an der Konversion von Acetyl-CoA zu Alkoholen beteiligt sind. Für die Ethanol-Produktion konnte eine 3-fache Steigerung nachgewiesen werden (Girbal, 1995).

Die Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (*adhE1*) bedingt zudem die Butanol-Produktion in *C. acetobutylicum* (Dürre, Fischer *et al.* 1995). Neben *adhE1* zeigte das Gen einer NADH-abhängigen Butanol-Dehydrogenase (*bdhB*) eine signifikant verstärkte Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Die hohe NADH-Verfügbarkeit der Zelle scheint die Expression der Butanol-Dehydrogenase (*bdhB*) zu induzieren und daraus resultierend die Butanol-Produktion zu steigern. In dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 konnte folglich eine 75 %ige Steigerung der Butanol-Konzentration nachgewiesen werden. Girbal *et al.* stützen diese Theorie. Die Aktivität der NADH-abhängigen Butanol-Dehydrogenase stieg bei einem erhöhten NADH/NAD⁺-Verhältnis und einem geringen ATP-Gehalt und resultierte in einer erhöhten Butanol-Produktion (Girbal and Soucaille 1994).

Die verminderte Hydrogenase HydA Aktivität scheint den NADH-Gehalt der Zelle zu steigern und dadurch die Lösungsmittel-Produktion zu induzieren. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass als Folge der Solventogenese eine verminderte Substratketten-Phosphorylierung verbunden mit der ATP-Produktion abläuft. Diese Vermutungen korrelieren indes nicht mit der Hypothese von Papoutsakis *et al.* Er berichtete von einer möglichen Schlüsselrolle des ATPs für die Produktselektivität in *C. acetobutylicum*. Bei einer niedrigen ATP-Konzentration in der Zelle würde die Produktion von Säuren unterstützt werden, wohingegen bei einer hohen ATP-Konzentration die Solventogenese induziert wird (Papoutsakis, 1983). Die Induktion der Solventogenese und die verminderte Substratketten-Phosphorylierung durch die Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität sprechen vielmehr dafür, dass die Hydrogenase HydA eine Schlüsselrolle in der Produktselektivität in *C. acetobutylicum* innezuhaben scheint.

Bei einer reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität infolge einer verminderten HydA Menge steigt die NADH-Verfügbarkeit der Zelle und NADH-abhängige Reaktionen der Solventogenese werden begünstigt.

Es stellt sich allerdings die Frage, wie eine reduzierte Hydrogenase HydA Aktivität die Produktion von Aceton stimulieren kann.

Für die Aceton-Produktion scheint der Gehalt der CoA-Transferase (CoAT) der limitierende Faktor zu sein (Tummala, Welker *et al.* 2003). Die kodierenden Gene der CoA-Transferase (*ctfA*, *ctfB*) bilden zusammen mit dem Gen der Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase *adhE1* das wesentliche genetische Element der Lösungsmittel-Produktion (*sol*-Operon) in *C. acetobutylicum* (Sauer, Dürre *et al.* 1995). Im oberen Abschnitt wurde bereits auf ein putatives Regulationssystem aufmerksam gemacht, dass die Expression der Dehydrogenasen an das NADH/NAD⁺-Verhältnis der Zelle anpasst. Der hohe NADH-Gehalt der Zelle infolge einer reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität lässt vermuten, dass die Expression des *sol*-Operons durch ein Regulationssystem induziert wird und der Gehalt der CoA-Transferase steigt. Das Regulationssystem und folglich der Gehalt CoA-Transferase könnten somit auch die Expression der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) sensieren und die Aceton-Produktion bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität steigern.

Darüber hinaus ist die Decarboxylierung von Acetoacetat zu Aceton eine spontan verlaufende unumkehrbare Reaktion. Es ist anzunehmen, dass die Decarboxylierung als Teil der Solventogenese die Reassimilation der Säuren unterstützt und das Gleichgewicht in Richtung der Aceton-Produktion zieht.

Gestützt werden diese Vermutungen durch die signifikant verstärkten Expressionen des *sol*-Operons (*ctfA*, *ctfB*, *adhE1*) und der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) sowie der 63 %ige Steigerung der Aceton-Konzentration in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3.

Die verstärkte Aceton-Produktion infolge einer reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität geht jedoch nicht mit den Beobachtungen von Hönicke *et al.* konform. Sie postulierten unter Verwendung des Hydrogenase-Inhibitors Methylviologen (MV) eine signifikante Reduktion der Aceton-Konzentration. Darüber hinaus zeigten sie, dass die Gene der CoA-Transferase (*ctfA*, *ctfB*) nicht reguliert bzw. reprimiert waren (Hönicke, Janssen *et al.* 2012). Es scheint, als würde Methylviologen als Hydrogenase-Inhibitor auch die Aktivität anderer Enzyme beeinflussen und dadurch die veränderte Produktselektivität des Organismus bedingen.

4.3 Veränderung des Transkriptionsverhalten in *C. acetobutylicum* bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität

Mit der Verminderung der Hydrogenase HydA Aktivität scheint der Elektronenfluss in Richtung der reduzierten Endprodukte gelenkt und die Solventogenese induziert zu werden. Es stellt sich jedoch die Frage, welche Veränderung eine reduzierte Hydrogenase HydA Aktivität auf das Transkriptionsverhalten in *C. acetobutylicum* bewirkt.

Transportsysteme

Zucker-Metabolismus. Eine Vielzahl von Bakterien entwickelten Mechanismen, die der selektiven Aufnahme und dem Katabolismus von Kohlenhydraten dienen. Dies ermöglicht ihnen ein schnellst mögliches Wachstum und folglich ein Vorteil im Konkurrenzverhalten gegenüber anderen Bakterien (Saier, Chauvaux *et al.* 1996; Bruckner and Titgemeyer 2002; Singh, Schmalisch *et al.* 2008). Das Phosphotransferase-System (PTS) ist der bevorzugte Aufnahme-Mechanismus für Kohlenhydrate bei anaeroben und fakultativen Bakterien. Das clostridiale PTS katalysiert die spezifische Bindung des Substrats, seinen Transfer durch die Zellmembran sowie dessen Phosphorylierung (Mitchell, Shaw *et al.* 1991; Tangney, Brehm *et al.* 1998; Tangney, Rouse *et al.* 1998; Tangney and Mitchell 2000). Untersuchungen zeigten, dass einige dieser Phosphotransferase-Systeme substrat-spezifisch induziert werden (Behrens, Mitchell *et al.* 2001; Tangney, Winters *et al.* 2001; Tangney, Galinier *et al.* 2003; Tangney and Mitchell 2007; Yu, Tangney *et al.* 2007). In Gegenwart von Glukose ist die Transkription von Genen für die Verwertung einer zweiten Kohlenstoff-Quelle deutlich reprimiert. Dadurch wird die maximale Verwertung der präferierten Glukose trotz Anwesenheit eines zweiten Kohlenhydrats gewährleistet (Grimmler, Held *et al.* 2010; Servinsky, Kiel *et al.* 2010). Dieses Phänomen weist auf eine Regulation durch die Kohlenstoff-Katabolit Repression hin und ist in Clostridien konserviert (Saier, Chauvaux *et al.* 1996; Bruckner and Titgemeyer 2002; Tangney, Galinier *et al.* 2003).

Die Transkriptionsanalysen bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität zeigten beim Wachstum auf der präferierten Kohlenstoff-Quelle Glukose eine signifikante Expression von Genen des Fruktose-(CA_C0231-CA_C0234), Laktose-(CA_C2963-CA_C2966) und Fruktose/Mannose-PTS (CA_P0066-CA_P0068).

Darüber hinaus konnte auch für das Gen eines putativen Xylulose-Protonen-Symporters (CA_C3422) eine deutlich erhöhte Expression nachgewiesen werden.

Es stellt sich die Frage, aus welchen Gründen *C. acetobutylicum* infolge einer verminderten Hydrogenase HydA Menge und einer daraus resultierenden verminderten Aktivität, eine Reihe Phosphotransferase-Systeme und Transporter für Kohlenhydrate induziert.

Die Transkriptionsdaten von Batch-Fermentationen mit Glukose als Substrat zeigten in der frühen stationären Wachstumsphase eine erhöhte Expression von Genen zur Verwertung der Monosaccharide (Fruktose, Galaktose, Mannose, Xylulose), Disaccharide (Maltose, Laktose, Saccharose) und der komplexen Kohlenhydrate (Xylan, Cellulose, Stärke, Glykogen) (Jones, Paredes *et al.* 2008). Einen Erklärungsansatz für diese signifikant erhöhten Expressionen trotz ausreichender Mengen von Glukose im Medium (44 % der Ausgangskonzentration) konnten die Autoren nicht liefern. Ein ähnliches Transkriptionsverhalten konnte für die Zellen eines Chemostaten beobachtet werden. Dabei zeigten am Zuckertransport involvierte Gene eine signifikante Induktion während der Solventogenese. Der Glukose-Verbrauch nimmt während der stationären Wachstumsphase ab und die Zelle scheint nach alternativen Kohlenstoff-Quellen zu suchen (Grimmler, Janssen *et al.* 2011). Vorhergehende Studien berichteten darüber hinaus von einer vorzeitigen Induktion des *shifts* in die Solventogenese acidogener Zellen als Reaktion auf die Zugabe des Hydrogenase-Inhibitors Methylviologen (MV) (Rao and Mutharasan 1987; Grupe and Gottschalk 1992).

Die Stämme *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 scheinen als Reaktion auf einer reduzierte Hydrogenase HydA Aktivität den NADH-Gehalt der Zelle zu steigern und die Solventogenese zu induzieren. Unterstützt wird diese Vermutung mit den signifikant verstärkten Expressionen Lösungsmittel-spezifischer Gene (*adc*, *ctfA/B*, *adhE1*, *bdhB*).

Darüber hinaus scheint die Zelle mit der Induktion von Genen des Zuckertransports nach alternativen Substraten zu suchen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen von Hönicke *et al.* untermauert. Mit der Zugabe von Methylviologen konnten sie eine signifikant erhöhte Expression von Genen des Laktose-, Mannose-, Fruktose- und Cellubiose-PTS nachweisen (Hönicke, Janssen *et al.* 2012).

Eisen-Stoffwechsel. Neben den Genen des Zuckertransports zeigten Gene der Eisenaufnahme eine signifikant verstärkte Expression bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität. In *E. coli* wurde eine Operon-Struktur zur anaeroben Aufnahme von Eisen (*feo*) charakterisiert (Kammler, Schon *et al.* 1993). Mit Hilfe der Genomanalyse von *C. acetobutylicum* konnte ein putatives *feo*-Operon (CA_C1029-CA_C1031) identifiziert werden. Untersuchungen in *E. coli* zeigten, dass das Operon der anaeroben Aufnahme von Eisen dient und ein entscheidender Faktor für den Eisen-Gehalt der Zelle darstellt. Dabei ist Eisen ein wesentlicher Bestandteil vieler Enzyme und für deren Aktivität unabdingbar. So benötigt beispielweise die Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) Eisen für die Aceton-Bildung (Westheimer, 1963). Die verstärkte Expression von *adc* bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität erhöht den Gehalt der Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) und steigert dadurch den Eisen-Bedarf der Zelle. Dies ist nur ein Erklärungsansatz für eine signifikant verstärkte Expression des *feo*-Operons bei verminderter Hydrogenase HydA Aktivität.

Eisen ist darüber hinaus ein wesentlicher Faktor für die Bildung von Eisen-Schwefel Zentren in Eisen-Schwefel Proteinen (Imlay 2006). Hydrogenasen, die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase sowie Ferredoxine zählen zu den Eisen-Schwefel Proteinen (Meyer 2000). Mit der Reduzierung der Hydrogenase HydA Menge auf Translationsebene wird die Aktivität der Hydrogenase vermindert. Es scheint, als würde die Zelle mit der erhöhten Expression des *feo*-Operons die Aktivität der Hydrogenase steigern wollen oder die Aktivität anderer Eisen-Schwefel Proteine stimulieren. Die Gene der [FeFe]-Hydrogenase HydB (*hydB*), der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (CA_C2229) oder der fünf Ferredoxine zeigten jedoch bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität keine Regulationen.

Im Rahmen einer leichten und subletalen Belüftung mit Sauerstoff erhöhte sich das Redox-Potential von *C. acetobutylicum* und für einzelne Gene des *feo*-Operons konnte ebenfalls eine erhöhte Expression unter O₂-Stress nachgewiesen werden (Hillmann, Doring *et al.* 2009). Dabei ist erwähnenswert, dass die [FeFe]-Hydrogenasen durch Sauerstoff irreversibel geschädigt werden und so die Expressionen des *feo*-Operons zu erklären sind (Erbes, King *et al.* 1979).

Sulfat-Reduktion und Cystein-Biosynthese. Bakterien können Sulfat für die Synthese organischer Schwefel-Metaboliten verwenden. Die stufenweise Sulfat-Reduktion führt zur Synthese von Cystein und Methionin (Andre, Even *et al.* 2008).

Cysteine scheinen über ihre Thiolgruppen eine koordinative Funktion in Eisen-Schwefel-Clustern auszuüben. Darüber hinaus erhöhen sie mit der Bildung von Disulfid-Brücken die Stabilität von Proteinen. Grimmer *et al.* postulierten für die Gene der Sulfat-Reduktion und der Cystein-Biosynthese eine signifikant verstärkte Expression während des solventogenen Wachstums (Grimmer, Janssen *et al.* 2011). Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass ein ähnliches Expressionsverhalten dieser Gene bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität und induzierter Solventogenese zu erwarten ist. Jedoch zeigten die Gene der Sulfat-Reduktion und der Cystein-Biosynthese (CA_C0102-CA_C104, CA_C0106-CA_C0110, CA_C0930) in den Transkriptionsanalysen eine signifikant verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero (s. Tabelle 7.16, Anhang).

Veränderung des Kohlenstoff-Flusses

C. acetobutylicum verfügt über drei Wege, Pyruvat oxidativ zu verwerten: Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (CA_C2229; EC 1.2.7.1); Pyruvat-Formiat-Lyase (CA_C0980; EC 2.3.1.54) und Pyruvat-Decarboxylase (CA_P0025; EC 4.1.1.1). Des Weiteren kann Pyruvat mit Hilfe der L-Laktat-Dehydrogenase (CA_C0267; EC 1.1.1.27) zu Laktat reduziert werden.

Die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ durch die O₂-sensitive Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase stellt den Hauptabbau-Weg von Pyruvat dar. Die Elektronen dieser Reaktion werden auf ein Ferredoxin übertragen (Meinecke, Bertram *et al.* 1989) und die angehäuften Reduktionsäquivalente wie reduziertes Ferredoxin in Form von H₂ entfernt.

Mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Menge auf Translationsebene wird die Aktivität dieses Enzyms vermindert und als Folge dessen weniger reduziertes Ferredoxin in Form von H₂ regeneriert. Der Kohlenstoff-Fluss durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wird demnach reduziert. Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase könnte auf diese Weise ein sogenanntes *bottleneck* für den Kohlenstoff-Fluss der Zelle darstellen.

Es stellt sich die Frage, wie *C. acetobutylicum* den entstandenen Kohlenstoff-Stau am Pyruvat infolge einer reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität umgehen kann.

C. acetobutylicum ist der einzige Organismus unter den solventogenen Clostridien, der über eine Pyruvat-Decarboxylase verfügt. Die Transkriptionsanalysen zeigten

eine signifikant verstärkte Expression des *pdc* Gens bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität. Für die Auflösung des Kohlenstoff-Staus scheint der Organismus das angehäuften Pyruvat aus der Glykolyse unter Abspaltung von CO₂ für die Ethanol-Bildung zu verwenden, ohne dabei CoA zu benötigen. Ähnliche Beobachtungen machten Grimmler *et al.* Sie zeigten, dass das Gen der Pyruvat-Decarboxylase (*pdc*) lediglich während des metabolischen *shifts* von der Acidogenese zur Solventogenese induziert war und dadurch die Ethanol-Produktion unabhängig von CoA gesteigert werden konnte (Grimmler, Janssen *et al.* 2011).

Neben der Oxidation von Pyruvat durch die Pyruvat-Decarboxylase verfügt *C. acetobutylicum* über einen reduktiven Weg den Kohlenstoff-Stau zu beseitigen. Die L-Laktat-Dehydrogenase (CA_C0267) katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat unter Verwendung des Reduktionsäquivalentes NADH.

Bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnte für das Gen einer L-Laktat-Dehydrogenase (CA_C0267) eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Diese Expressionsdaten legen die Vermutung nahe, dass der Kohlenstoff-Stau am Pyruvat durch einen verminderten Kohlenstoff-Fluss in Richtung des Acetyl-CoA mit der Produktion von Laktat beseitigt wird. Gleichzeitig können die Reduktionsäquivalente in Form von NADH aus der Glykolyse mit der Bildung von Laktat entfernt werden. Dieser Erklärungsansatz zur Beseitigung eines angenommenen Kohlenstoff-Staus wird durch andere Arbeiten untermauert. In Anwesenheit des Hydrogenase-Inhibitors Methylviologen und einem pH-Wert > 5 konnte in *C. acetobutylicum* eine erhöhte Laktat-Produktion beobachtet werden (Peguin, 1994) (Peguin and Soucaille 1996). Es ist anzunehmen, dass die paralogen Gene CA_C0267 und CA_C1543 verstärkt exprimiert waren. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich beim Wachstum unter Eisen-limitierenden Bedingungen und erhöhtem pH-Wert (> 5) (Hanson and Rodgers 1946; Bahl, Gottwald *et al.* 1986). Die Autoren um Bahl *et al.* erklärten diese erhöhte Produktion von Laktat mit einer verminderten Aktivität der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase infolge der Eisen-Limitierung. Die Reduktionsäquivalente der Glykolyse würden bevorzugt über die Laktat-Dehydrogenase entfernt werden und weniger über die Reduktion von Acetyl-CoA zu Alkoholen.

Die L-Laktat-Dehydrogenase besitzt ein pH-Optimum von 5,8 (Freier and Gottschalk, 1987) und ist bei einem pH-Wert unter 5 inaktiv (Jones and Woods 1986). Dies würde erklären, warum der Kohlenstoff-Fluss während des stationären

Wachstums in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 zu einem größeren Teil über die Pyruvat-Decarboxylase verläuft.

Clostridien können alternativ Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat mit Hilfe der Pyruvat-Formiat-Lyase konvertieren. Die physiologische Rolle des Enzyms im clostridialen Metabolismus ist bis dato unbekannt, jedoch wird darüber spekuliert, dass es eher der anabolischen als der katabolische Funktion dient (Wood and Jungermann 1972; Weidner and Sawers 1996). In *C. acetobutylicum* konnte das kodierende Gen der Pyruvat-Formiat-Lyase identifiziert werden (Nölling, Breton *et al.* 2001). In einer persönlichen Mitteilung von Dr. Armin Ehrenreich wurde auf die Bedeutung Pyruvat-Formiat-Lyase für die Solventogenese in *C. acetobutylicum* hingewiesen. Ohne das Enzym könne der Organismus keine Lösungsmittel-Produktion betreiben (persönliche Mitteilung, Dr. Armin Ehrenreich). Es ist demnach anzunehmen, dass *pflB* in den Transkriptionsanalysen eine signifikant verstärkte Expression bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität und induzierter Solventogenese zeigt. Entgegen den Erwartungen zeigte jedoch *pflB* eine signifikant verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero.

Mit der Synthese von Acetyl-CoA wird die Substratketten-Phosphorylierung und damit die Energieproduktion in Form von ATP in *C. acetobutylicum* aufrechterhalten. Ohne die Bildung von Acetyl-CoA würde der Organismus eine wichtige Energie-Quelle verlieren. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass trotz der Reduktion der Hydrogenase HydA Menge auf Translationsebene durch die Antisense-RNA Technologie ein gewisser Kohlenstoff-Fluss in Richtung des Acetyl-CoA besteht.

Die Konversion zweier Acetyl-CoA Moleküle zu Acetoacetyl-CoA wird durch die Thiolase katalysiert. In *C. acetobutylicum* existieren zwei paraloge Gene der Thiolase (*thlA*, *thlB*). Grimmer *et al.* und Winzer *et al.* berichten von einer antagonistischen Regulation beider Gene. Während das chromosomal lokalisierte *thlA* (CA_C2873) unter acidogenen Bedingungen induziert war, konnte für das auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisierte *thlB* (CA_P0078) eine signifikante Expression während des metabolischen *shifts* in die Solventogenese beobachtet werden (Winzer, Lorenz *et al.* 2000; Grimmer, Janssen *et al.* 2011). Bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnte ein ähnliches antagonistisches Expressionsverhalten beider Gene nachgewiesen werden. Für *thlA* wurde keine Änderung seitens der Expression

ermittelt. Die signifikante Expression des *thlB* unter solventogenen Bedingungen scheint indes den Acetoacetyl-CoA Gehalt der Zelle zu steigern und die angehäuften Säuren Acetat und Butyrat für ihre Reassimilation zu aktivieren.

C. acetobutylicum verfügt über zwei Sets von Genen, welche für die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (CA_C2009, CA_C2708) und die Enoyl-CoA-Hydratase (CA_C2012, CA_C2016, CA_C2712) kodieren. Während die Gene *mmgB* (CA_C2009) und *fadB* (CA_C2012, CA_C2016) in der Fettsäure-Biosynthese involviert sind, katalysieren *hbd* (CA_C2708) und *crt* (CA_C2712) die Umsetzung von Acetoacetyl-CoA zu Crotonyl-CoA. In den Transkriptionsanalysen konnte für die Gene der 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (*hbd*) und der Crotonase (*crt*) bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität keine Expressionsänderung nachgewiesen werden. Diese Gene scheinen durch die reduzierte Hydrogenase HydA Aktivität und die daraus resultierende vorzeitige Solventogenese nicht induziert zu werden um ausgehend von Acetoacetyl-CoA vermehrt Crotonyl-CoA zu bilden. Die Transkriptionsdaten von Chemostaten-Zellen stützen diese Vermutung. Für die Gene *hbd* (CA_C2708) und *crt* (CA_C2712) konnten nur unter acidogenen Bedingungen signifikante Expressionen nachgewiesen werden (Grimmler, Janssen *et al.* 2011).

In *C. acetobutylicum* bilden die Gene *hbd* (CA_C2708), *crt* (CA_C2712), *bcd* (CA_C2711), *etfA* (CA_C2709) und *etfB* (CA_C2710) eine Operon-Struktur (Wang, Li *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Gene einer Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*bcd*) und die der α - und β -Untereinheiten eines Elektronenübertragenden Flavoproteins (*etfA*, *etfB*) gleichzeitig exprimiert werden. Dabei ist die Anwesenheit von EtfA und EtfB für die Aktivität der Butyryl-CoA-Dehydrogenase unabdingbar (Boynton, Bennet *et al.* 1996). In den Transkriptionsanalysen bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnte für die Gene *bcd*, *etfA* und *etfB* ein ähnliches Expressionsverhalten wie für *hbd* und *crt* ermittelt werden. Dieses Transkriptionsverhalten der Operon-Struktur (Wang, Li *et al.* 2011) lässt vermuten, dass die Gene bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität nicht an der Bildung von Butyryl-CoA beteiligt sind. Dabei stehen die Transkriptionsdaten der Operon-Struktur mit jenen in Gegenwart des Hydrogenase-Inhibitors Methylviologen nicht im Einklang (Hönicke, Janssen *et al.* 2012). Die Autoren berichten von einer erhöhten Expression dieser Gene in Anwesenheit von Methylviologen und spekulieren über eine vermehrte Produktion von Butyryl-CoA und folglich von Butanol.

Es stellt sich die Frage, über welche Stoffwechselwege *C. acetobutylicum* bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität das Intermediärprodukt Butyryl-CoA für die Synthese der C₄-Komponenten produziert, wenn die Gene für die Konversion von Acetoacetyl-CoA zu Butyryl-CoA nicht reguliert sind.

Die Antwort auf diese Fragestellung liegt in der Produktion und Reassimilation der Säuren Acetat und Butyrat. Die Gene der Phosphat-Butyryltransferase (*ptb*) und der Butyrat-Kinase (*buk*) bilden in *C. acetobutylicum* eine Operon-Struktur (Cary, Petersen *et al.* 1988). Mit den Transkriptionsanalysen bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnte sowohl für die Operon-Struktur als auch für die Gene der Phosphat-Acetyltransferase (*pta*) und der Acetat-Kinase (*ackA*) keine Expressionsänderung nachgewiesen werden. *C. acetobutylicum* scheint infolge einer reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität und eines daraus resultierenden *bottleneck* für den Kohlenstoff-Fluss an der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase weniger Acetat und Butyrat zu bilden.

Ähnliche Beobachtungen fanden die Autoren um Meyer *et al.* Die Belüftung einer Glukose-limitierenden Chemostaten Kultur mit dem reversiblen Hydrogenase-Inhibitor CO resultierte in einer deutlichen Minderung der Acetat-, Butyrat- und H₂-Produktion (Meyer, 1986).

Im oberen Teil dieses Abschnittes wird auf eine signifikant verstärkte Expression des *thlB* bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität hingewiesen. Mit der Expression von *thlB* könnte der Acetoacetyl-CoA Gehalt der Zelle gesteigert und die produzierten Säuren zur Reassimilation aktiviert werden. Die signifikant verstärkte Induktion der CoA-Transferase (*ctfA*, *ctfB*) untermauert diese Theorie. Mit Hilfe der Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat CoA Transferase (CtfA, CtfB) werden die gebildeten Säuren Acetat und Butyrat in Acetyl-CoA und vermehrt in Butyryl-CoA umgesetzt (Rogers, 1986). Dies würde erklären, wie *C. acetobutylicum* bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität Butyryl-CoA synthetisiert und den Kohlenstoff-Fluss in Richtung der C₄-Komponenten lenkt.

Die Reduktion von Butyryl-CoA zu Butyraldehyd ist an die Aktivität einer NADH-abhängigen bifunktionalen Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase gebunden. In *C. acetobutylicum* konnten zwei paraloge Gene der Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (*adhE1*, *adhE2*) auf dem Megaplasmid pSOL1 identifiziert werden. Bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnten für die paralogen Gene *adhE1* und *adhE2* unterschiedliche Expressionen ermittelt werden. Während *adhE2* keine

Expressionsänderung zeigte, konnte für *adhE1* eine signifikante Expression bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität nachgewiesen werden. Es ist demnach anzunehmen, dass AdhE1 eine essentielle Rolle in der Konversion von Butyryl-CoA zu Butyraldehyd bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität innezuhaben scheint. Darüber hinaus lassen die Expressionsdaten der Gene *adhE1* und *adhE2* auf eine antagonistische Regulation schließen. Diese Vermutung wird durch die Transkriptionsanalysen von Chemostaten-Zellen bestätigt. Während *adhE2* unter acidogenen Bedingungen signifikant induziert ist und während des metabolische *shifts* in die Solventogenese reprimiert wird, konnte für *adhE1* eine deutliche Expression unter solventogenen Bedingungen nachgewiesen werden (Winzer, Lorenz *et al.* 2000; Grimmer, Janssen *et al.* 2011).

Die Reduktion von Butyraldehyd zu Butanol wird in *C. acetobutylicum* von zwei Butanol-Dehydrogenasen (CA_C3299, CA_C3298) katalysiert. Die chromosomal lokalisierten Gene *bdhA* (CA_C3299) und *bdhB* (CA_C3298) sind dabei in benachbarten monocistronischen Operon-Strukturen organisiert (Petersen, Welch *et al.* 1991; Walter, Bennett *et al.* 1992). In den Transkriptionsanalysen bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnten für die Gene *bdhA* und *bdhB* unterschiedliche Expressionsdaten ermittelt werden. Während *bdhA* keine Expressionsänderung zeigte, konnte für *bdhB* eine signifikant verstärkte Expression bei verminderter Hydrogenase HydA Aktivität nachgewiesen werden. Es scheint, als sei das Enzym BdhB neben der Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase AdhE1 vorwiegend für die Butanol-Produktion in den Stämmen mit reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität verantwortlich. Darüber hinaus sprechen die Expressionsdaten für eine unterschiedliche Regulation beider Gene auf Transkriptionsebene.

Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtungen anderer Forschungsarbeiten. Mit der Induktion der Solventogenese durch die Minderung des pH-Wertes in kontinuierlichen Kulturen konnte eine Transkription der Gene *bdhA*, *bdhB* und *adhE1* ermittelt werden (Fischer, Helms *et al.* 1993; Dürre, Fischer *et al.* 1995). Jedoch konnte in solventogenen Kulturen unter *steady-state* Bedingungen kein Transkript des *bdhA* Gens nachgewiesen werden, obwohl die Transkription von *bdhB* und *adhE1* ermittelt werden konnte (Girbal, 1995).

Die Ethanol-Produktion in *C. acetobutylicum* ist an die Aktivitäten der bifunktionalen Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenasen AdhE1 und AdhE2 gebunden. Im Vergleich zur Butanol-Synthese katalysieren die Enzyme indes die vollständige

Reduktion von Acetyl-CoA zu Ethanol. Mit der Produktion von Ethanol kann der Organismus somit die Reduktionsäquivalente in Form von NADH verbrauchen und NAD^+ regenerieren. Die Gene *adhE1* und *adhE2* sind auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisiert. Dabei unterscheiden sie sich in ihrer genetischen Organisation deutlich voneinander. Während *adhE2* (CA_P0035) ein monocistronisches Operon bildet (Fontaine, Meynial-Salles *et al.* 2002), ist *adhE1* in dem polycistronischen *sol*-Operon organisiert (s. Abbildung 4.1).

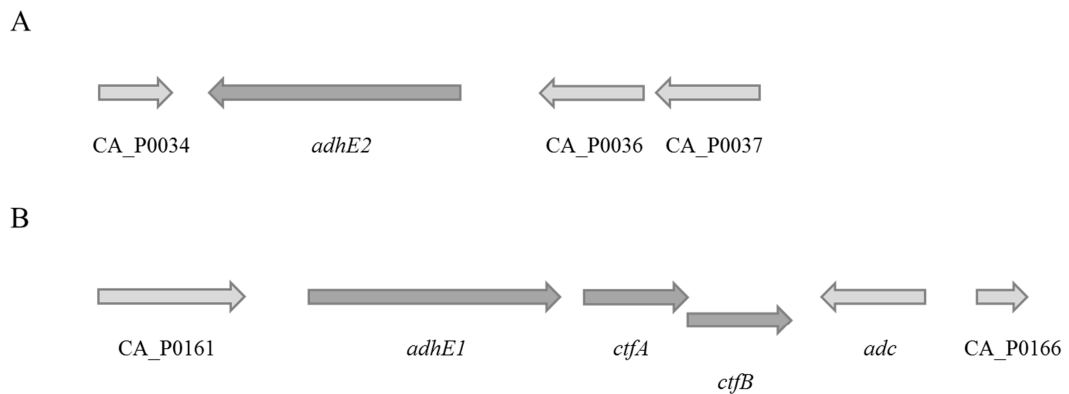


Abbildung 4.1: Genetischer Kontakt von *adhE1* und *adhE2* in *C. acetobutylicum*.
A: Dargestellt ist das monocistronische Operon von *adhE2* (Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase AdhE2) mit seinen up- und downstream Bereichen (hell-grau). **B:** Dargestellt ist das *sol*-Operon mit den Genen *adhE1* (Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase AdhE1), *ctfA* und *ctfB* (CoA-Transferase CtfAB) (dunkel-grau) mit seinen up- und downstream Bereichen (hell-grau). *adc*: Gen der Acetoacetat-Decarboxylase (Adc). Erläuterung siehe Text.

Zusammen mit den beiden Untereinheiten der Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat CoA Transferase (*ctfA*, *ctfB*) bildet *adhE1* ein wesentliches genetisches Element (*sol*-Operon) für die Lösungsmittel-Produktion in *C. acetobutylicum* (Sauer and Dürre, 1995). Im oberen Abschnitt wurde auf die antagonistische Regulation der Gene *adhE1* und *adhE2* aufmerksam gemacht. Während *adhE2* bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität nicht reguliert war, konnten für die Gene des *sol*-Operons (*adhE1*, *ctfA*, *ctfB*) eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Dieses Expressionsverhalten spricht zum einen für die Reassimilation produzierter Säuren und zum anderen für die vermehrte Produktion von Ethanol durch die Aktivität der Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase AdhE1. Die Ethanol-Produktion scheint des Weiteren durch die Verlagerung des Kohlenstoff-Flusses erhöht zu werden. Der verminderte Substratfluss durch die Pyruvat-Ferredoxin-

Oxidoreduktase wird mit der Aktivität der Pyruvat-Decarboxylase aufgelöst und das Pyruvat aus der Glykolyse mit Hilfe von AdhE1 auf Kosten der Aceton- und Butanol-Produktion direkt zu Ethanol umgesetzt. Die Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase AdhE1 scheint demzufolge eine zentrale Rolle in der Ethanol-Produktion bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität innezuhaben. Diese Vermutung wird durch ein ähnliches Expressionsverhalten von *adhE1* in Chemostaten-Kulturen mit der Steigerung der Ethanol-Produktion unter solventogenen Wachstumsbedingungen unterstützt (Grimmler, Janssen *et al.* 2011).

Neben den reduzierten Endprodukten Ethanol und Butanol produziert *C. acetobutylicum* das Lösungsmittel Aceton. Das Gen der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) ist in einem monocistronischen Operon organisiert (Gerischer and Dürre 1992) und *downstream* des *sol*-Operon lokalisiert (s. Abbildung 4.1). Das Enzym Adc katalysiert dabei die Decarboxylierung von Acetoacetat zu Aceton. Für *adc* konnte bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Untersuchungen zeigten jedoch, dass für die Aceton-Produktion nicht allein die Expression des *adc* Gens, sondern vielmehr der Gehalt der CoA-Transferase (CoAT) der limitierende Faktor zu sein scheint (Tummala, Welker *et al.* 2003). Die erhöhte Expression der CoA-Transferase (*ctfA*, *ctfB*) und die vermehrte Aceton-Produktion unterstützen die Erkenntnisse von Tummala *et al.* *C. acetobutylicum* scheint bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität die Aceton-Produktion als Reaktion auf die Aktivierung der Säuren (Acetoactyl-CoA Produktion durch Thiolase) und deren Reassimilation verstärkt zu induzieren. Diese Annahme steht jedoch nicht im Einklang mit den Beobachtungen früherer Forschungsarbeiten. Unter Fe-limitierenden Bedingungen und in Anwesenheit des Hydrogenase-Inhibitors Methylviologen konnte keine Produktion von Aceton in *C. acetobutylicum* beobachtet werden (Peguín and Soucaille 1995).

Veränderung des Elektronen-Flusses

Für die Optimierung der Energieproduktion entwickelten Clostridien verschiedene Strategien. In *C. acetobutylicum* werden die Reduktionsäquivalente wie reduziertes Ferredoxin in Form von Wasserstoff entfernt und so Energie aus der Substratketten-Phosphorylierung gewonnen. Die Hydrogenase HydA nimmt dabei eine zentrale Rolle in der H₂-Produktion und Regeneration des reduzierten Ferredoxins ein (King,

Posewitz *et al.* 2006). Die Regeneration von Reduktionsäquivalenten und folglich die Energiegewinnung durch die Substratketten-Phosphorylierung ist in *Clostridium beijerinckii* an die Aktivität einer *trimeric bifurcating hydrogenase* gekoppelt (Schut and Adams 2009). Das Enzym gewährleistet die gleichzeitige Oxidation von reduziertem Ferredoxin und NADH unter Bildung von H₂. Vergleichend zu *C. acetobutylicum* kann *C. beijerinckii* NADH dabei durch die Produktion von H₂ verbrauchen. Doch ist diese Art der H₂-Produktion im Gegensatz zu jener basierend auf Ferredoxin energetisch ungünstiger, da vermutlich ein geringerer H₂-Partialdruck entsteht. In diesem Zusammenhang wird die zentrale Rolle der Hydrogenase HydA in der Energie-Optimierung in *C. acetobutylicum* verdeutlicht.

Die Modifikation der Hydrogenase HydA unter Verwendung der Antisense-RNA Konstrukte hatte nachweislich keine Auswirkungen auf das Transkriptionsverhalten der Hydrogenase. Es ist daher anzunehmen, dass mit Hilfe der Antisense-RNA Technologie die Proteinmenge der Hydrogenase auf Translationsebene reduziert und dadurch die Aktivität vermindert wurde. Die [FeFe]-Hydrogenase HydB und die [NiFe]-Hydrogenase HupSL spielen in der H₂-Produktion in Anwesenheit der Antisense-RNA Konstrukte eine untergeordnete Rolle, da ihre Genexpressionen nicht nachweisbar oder nicht reguliert vorlagen.

Die Reduzierung der Hydrogenase HydA Menge vermindert deren Enzymaktivität und verursacht eine Veränderung des Kohlenstoff-Flusses in *C. acetobutylicum* (s. Abschnitt Veränderung des Kohlenstoff-Flusses). Es stellt sich daher die Frage, welchen Einfluss eine reduzierte Hydrogenase HydA Aktivität auf den Elektronen-Fluss des Organismus ausübt.

Der physiologische Elektronen-Donor der Hydrogenase HydA ist das reduzierte Ferredoxin. Es entsteht während der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die Aktivität der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase. In *C. acetobutylicum* konnten fünf ORF's von Ferredoxinen (CA_C0075, CA_C0105, CA_C0303, CA_C3527, CA_C3621) identifiziert werden (Nölling, Breton *et al.* 2001). Die Transkriptionsanalysen unter logarithmischen Wachstum zeigten eine verminderte Expression der Gene CA_C0303 und CA_C0105 bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität. Es ist anzunehmen, dass mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase vermindert abläuft und folglich weniger

reduziertes Ferredoxin, welches mit der Hydrogenase HydA interagieren kann, entsteht.

Untersuchung in *C. acetobutylicum* zeigten, dass das Ferredoxin CA_C0303 10-mal effektiver mit der Hydrogenase HydA interagiert als im Vergleich das Ferredoxin CA_C3527. Aus diesem Grund ist Ferredoxin CA_C0303 das Haupt-Ferredoxin in *C. acetobutylicum* (Demuez, Cournac *et al.* 2007; Guerrini, Burlat *et al.* 2008).

Die Expressionsdaten von CA_C0303 bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität stützen die Erkenntnisse anderer Forschungsgruppen und legen die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Ferredoxin CA_C0303 um jenes handelt, das direkt mit der Hydrogenase HydA interagiert und die Reduktion der Protonen und folglich die H₂-Produktion beeinflusst.

Als Folge der reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität ist eine Anhäufung von reduziertem Ferredoxin und folglich ein Überschuss an Protonen im Cytoplasma denkbar. Der Überschuss an Protonen würde die Substratketten-Phosphorylierung und dadurch die Energie-Gewinnung in Form von ATP mindern.

Neben der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase verfügt *C. acetobutylicum* über zwei weitere Enzyme, reduziertes Ferredoxin unter acidogenen Wachstumsbedingungen zu generieren. Eines dieser Enzyme ist die NADH-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Vasconcelos, Girbal *et al.* 1994) (Girbal, 1995). Das Enzym, dessen Gen bislang nicht identifiziert werden konnte, soll die thermodynamisch ungünstige Reduktion des Ferredoxins durch NADH katalysieren. Glukose-Glycerol Chemostaten-Kulturen sind durch ein hohes NADH/NAD⁺-Verhältnis gekennzeichnet (Girbal and Soucaille 1994). Jedoch weisen sie eine geringe Expression der NADH-Ferredoxin-Oxidoreduktase auf (Vasconcelos, Girbal *et al.* 1994). Es ist anzunehmen, dass infolge der reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität und einer Anhäufung von reduziertem Ferredoxin, die Aktivität einer möglichen NADH-Ferredoxin-Oxidoreduktase vermindert vorliegt um kein zusätzlich reduziertes Ferredoxin zu bilden.

In *Clostridium klyveri* bilden die Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd) und die α - und β -Untereinheiten eines Elektronen-übertragenden Flavoproteins (EtfA, EtfB) einen Proteinkomplex. Der Komplex katalysiert die NADH-abhängige Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA und bedingt durch diese exergonische Reaktion, wird ebenfalls die NADH-abhängige Reduktion von Ferredoxin ermöglicht (Herrmann,

Jayamani *et al.* 2008; Li, Hinderberger *et al.* 2008; Seedorf, Fricke *et al.* 2008; Köpke, Held *et al.* 2010). Das Vorhandensein eines Bcd/EtfAB-Komplexes in *C. acetobutylicum* spricht ebenfalls für eine Butyryl-CoA abhängige Reduktion von Ferredoxin unter Verwendung von NADH. Das gebildete reduzierte Ferredoxin kann für die H₂-Produktion und letztlich zur Energie-Optimierung durch die Substratketten-Phosphorylierung genutzt werden. Bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnte indes für den Bcd/EtfAB-Komplex keine Regulation oder eine signifikant erhöhte Expression der *etfA* und *etfB* Gene in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero nachgewiesen werden. Es scheint, als würde *C. acetobutylicum* bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität eine zusätzliche Synthese von reduziertem Ferredoxin unterbinden, da dessen Regeneration über die Hydrogenase HydA lediglich vermindert abläuft. Diese Erkenntnisse stehen indes nicht mit den Genexpressionsdaten des Bcd/EtfAB-Komplex in Anwesenheit des Hydrogenase-Inhibitors Methylviologen im Einklang (Hönicke, Janssen *et al.* 2012). Die Autoren berichten von einem verstärkten Expressionsverhalten der Gene CA_C2709-CA_C2711.

C. acetobutylicum fehlt die Möglichkeit seine Elektronen über eine Elektronentransportkette auf terminale Elektronen-Akzeptoren (Nitrat, Sauerstoff, Sulfat) zu übertragen und dadurch Energie zu generieren. Aus diesem Grund muss der Organismus seine Elektronen-Träger wie reduziertes Ferredoxin oder NADH über die Produktion von H₂ und reduzierten Endprodukten entfernen. Mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität wird unterdessen eine Regeneration des reduzierten Ferredoxins deutlich vermindert. Es stellt sich daher die Frage, welche alternativen Wege *C. acetobutylicum* zur Regeneration des reduzierten Ferredoxins verwendet.

In *C. beijerinckii* konnten kodierende Gene für einen membran-gebundenen Rnf-Komplex identifiziert werden (Biegel and Müller 2011; Biegel, Schmidt *et al.* 2011). Die Ferredoxin-abhängige NAD⁺-Reduktion ist dabei an die Erzeugung eines Protonengradienten gekoppelt, wodurch die Regeneration des reduzierten Ferredoxins für die Energiekonservierung in Form von ATP genutzt werden kann (Herrmann, Jayamani *et al.* 2008). Der Nachteil dieser Art reduziertes Ferredoxin zu regenerieren, besteht in der Produktion von NADH. Dieses muss auf Kosten einer verminderten Substratketten-Phosphorylierung während der Synthese von Säuren

durch die Produktion reduzierter Endprodukte regeneriert werden. *C. acetobutylicum* ist jedoch eines der wenigen Clostridien, die über diesen Rnf-Komplex nicht verfügen, sondern ihr Ferredoxin über eine schnellere und effektivere H₂-Produktion regenerieren.

Das Fehlen eines Rnf-Komplexes und die Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität legen die Vermutung nahe, dass *C. acetobutylicum* über andere Wege verfügt, reduziertes Ferredoxin zu regenerieren.

Girbal *et al.* berichten im Zusammenhang mit einem hohen NADH/NAD-Verhältnis und einer niedrigen intrazellulären ATP Konzentration von einer verstärkten Expression einer Ferredoxin-NAD⁺-Reduktase (Girbal and Soucaille 1994). Das Enzym katalysiert die Reduktion von NAD⁺ durch reduziertes Ferredoxin, wodurch der NADH-Gehalt der Zelle steigt (Vasconcelos, Girbal *et al.* 1994). Mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität scheint die ATP-Produktion infolge der Substratketten-Phosphorylierung abzunehmen und die Menge an reduziertem Ferredoxin zu steigen (s. Abbildung 4.2).

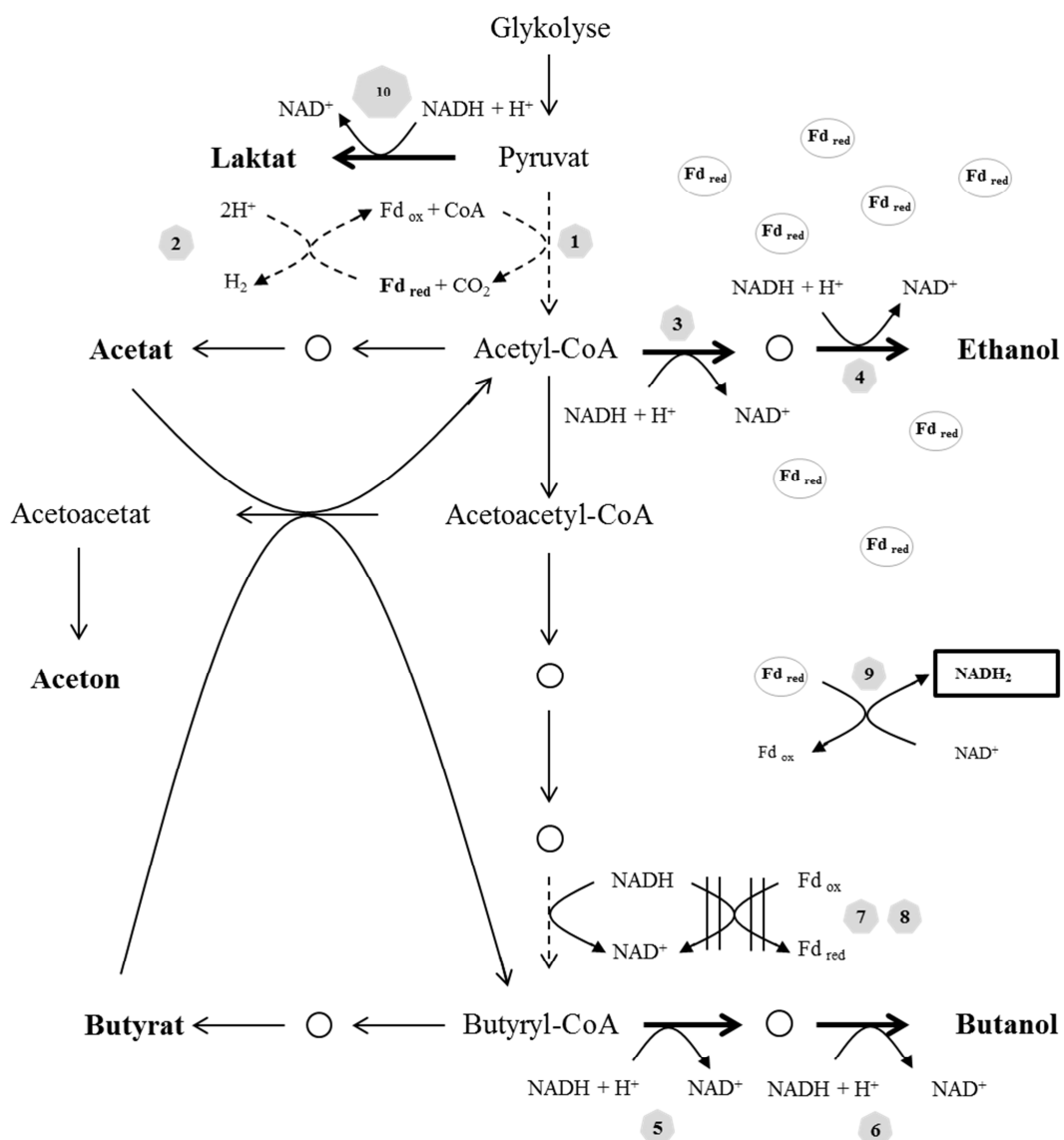


Abbildung 4.2: Veränderung des Elektronen-Flusses infolge einer reduzierten Hydrogenase HydA Aktivität in Anwesenheit einer Ferrdoxin-NAD⁺-Reduktase. Reaktionswege des Elektronen-Fluss, die aufgrund einer reduzierten Enzymaktivität (HydA) oder keiner Veränderung der Expression (CA_C2229, *bcd*) vermindert ablaufen, sind mit Hilfe gestrichelter Reaktionspfeile gekennzeichnet. Die Anhäufung von reduziertem Ferredoxin ist durch umrandete Symbole markiert. NADH-abhängige Reaktionen, die von der erhöhten NADH-Verfügbarkeit der Zelle begünstigt werden, sind durch einen breiteren Reaktionspfeil gekennzeichnet. Reaktionswege, die unter diesen Umständen nicht vollzogen werden, sind durchgestrichen. **1.** Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; **2.** Hydrogenase HydA; **3.** Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); **4.** Acetaldehyd-Dehydrogenase, Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); **5.** Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (AdhE1, AdhE2); **6.** Butanol-Dehydrogenase (BdhA, BdhB); **7.** Butyryl-CoA-Dehydrogenase; **8.** Elektronen-übertragende Flavoproteine (EtfA/EtfB); **9.** Ferrdoxin-NAD⁺-Reduktase; **10.** L-Laktat-Dehydrogenase. Zwischenprodukte des Stoffwechsels (○). Erläuterung siehe Text.

Die Anhäufung von reduziertem Ferredoxin lässt vermuten, dass infolge der Ferredoxin-NAD⁺-Reduktase Aktivität die NADH-Konzentration der Zelle steigt (Rao and Mutharasan 1987; Grupe and Gottschalk 1992) und NADH-abhängige Reaktionen begünstigt werden. Die Regeneration des reduzierten Ferredoxins würde demnach mit der Produktion der reduzierten Endprodukten Laktat, Butanol und Ethanol einhergehen. Jedoch ist die Reaktion der Ferredoxin-NAD⁺-Reduktase umstritten, da sie mit einer ineffektiven Energieverwertung verbunden ist und in einer unvorteilhaften Ansammlung von NADH resultieren würde.

Aus diesem Grund rückt erneut die Frage in den Vordergrund, welche Enzyme an der Regeneration des reduzierten Ferredoxins und folglich an der Synthese von NADH beteiligt sind, wodurch die vermehrte Ethanol- und Butanol-Produktion zu erklären wären.

Riboflavine (Vitamin B₂) dienen als essentielle Vorstufen der Flavin-Synthese (FAD, FMN). Die Coenzyme FAD und FMN sind als prosthetischen Gruppen in einer Vielzahl von Redoxenzymen enthalten und können sowohl zwei aufeinander folgende Ein-Elektronen Transfer-Prozesse als auch einen Zwei-Elektronen-Transfer durchführen (Massey 2000). Bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität konnten für einzelne Gene der Riboflavin-Synthese (CA_C0591, CA_C0592) erhöhte Expressionen nachgewiesen werden (s. Tabelle 7.15, Anhang). Die Expressionsdaten legen die Vermutung nahe, dass die Synthese der Coenzyme FAD und FMN unterstützt wird.

In *C. acetobutylicum* konnten neben den Genen CA_C2709 (*etfA*) und CA_C2710 (*etfB*) zwei weitere α - und β -Untereinheiten (*etfA* CA_C2543; *etfB* CA_C2544) eines Elektronen-übertragenden Flavoproteins mit einer FAD/FMN-enthaltenden Dehydrogenase (CA_C2542) identifiziert werden. Dabei ist die physiologische Rolle dieses Gen-Clusters bislang unbekannt. In den Transkriptionsanalysen bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität zeigten die Gene CA_C2542-CA_C2544 eine signifikant verstärkte Expression. Es ist anzunehmen, dass die FAD/FMN-enthaltende Dehydrogenase mit den α - und β -Untereinheiten eines Elektronen-übertragenden Flavoproteins (EtfA, EtfB) an der Regeneration des reduzierten Ferredoxins und folglich an der Synthese des Reduktionsäquivalents NADH beteiligt ist (s. Abbildung 4.3).

Das reduzierte Ferredoxin könnte mit einer Art Kontroll- oder Regulationssystem interagieren und die Dehydrogenase an die Redoxkraft der Zelle anpassen. Je nach Verfügbarkeit und Menge des reduzierten Ferredoxins würde die Reduktion von NAD^+ durch die FAD/FMN-enhaltende Dehydrogenase und den EtfAB Komponenten erfolgen und dadurch der NADH-Gehalt der Zelle gesteigert werden. Über das Vorhandensein eines derartigen Kontrollsystems in *C. acetobutylicum* ist jedoch bis dato nichts bekannt. Es würde allerdings den Zusammenhang zwischen der Regeneration des reduzierten Ferredoxins und der Steigerung der NADH-Verfügbarkeit der Zelle erklären, in dessen Folge nachweislich NADH-abhängige Reaktionen (Butanol, Ethanol) induziert werden.

Butanol-Stress

Die Energie-Produktion in *C. acetobutylicum* wird durch die Verlagerung der Elektronen von reduziertem Ferredoxin zu molekularem H_2 optimiert. Dadurch muss der Organismus weniger Reduktionsäquivalente in Form von NADH verbrauchen und ein schnelleres Wachstum verbunden mit einer höheren ATP-Produktion wird ermöglicht. Mit der erhöhten ATP-Produktion steigt indes der Acetat- und Butyrat Gehalt der Zelle. Aufgrund der Tatsache, dass erhöhte Konzentrationen von Butyrat den Protonengradient der Cytoplasma-Membran stören, werden gebildete Säuren reassimiliert und zusammen mit dem verbliebenen Substrat zu den Lösungsmitteln Aceton, Butanol und Ethanol umgesetzt (Dürre, 2005) (Harris, Welker *et al.* 2002). Die Lösungsmittel-Produktion ist somit eine metabolische Verlängerung der Lebensdauer des Organismus um Zeit für die Sporulation zu gewinnen.

Mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Menge auf Translationsebene wird deren Aktivität vermindert und der Gehalt an reduziertem Ferredoxin gesteigert. Im Abschnitt „Veränderung des Elektronen-Flusses“ wird auf die verschiedenen Möglichkeiten des Organismus, reduziertem Ferredoxin zu regenerieren und dadurch die NADH-Konzentration der Zelle zu steigern, eingegangen. Mit der erhöhten NADH-Konzentration der Zelle werden NADH-abhängige Reaktionen begünstigt und die Produktion von Lösungsmitteln (Butanol, Ethanol) steigt. Lösungsmittel in erhöhten Konzentrationen sind indes toxisch für den Organismus (Dürre, Bohringer *et al.* 2002). So zeigten Untersuchungen, dass bei Butanol-Konzentration von über 2 % in der Zelle, die Fluidität der Cytoplasma-Membran steigt (Ingram 1976; Vollherbst-Schneck, Sands *et al.* 1984; Baer, Blaschek *et al.* 1987; Baer, Bryant *et al.*

1989), und Transport-Proteine (Ounine, Petidmange *et al.* 1985) (Bowles, 1985; Moreira, 1981) sowie ATPasen (Terracciano und Kashket, 1986) irreversibel geschädigt werden.

Es stellt sich daher die Frage, welche Auswirkungen eine erhöhte Butanol-Konzentration auf das Transkriptionsverhalten in *C. acetobutylicum* ausübt.

Im oberen Abschnitt dieser Arbeit wird auf die kodierenden Gene einer 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (CA_C2009) und einer Enoyl-CoA-Hydratase (CA_C2012, CA_C2016) verwiesen. Die Gene *mmgB* (CA_C2009) und *fadB* (CA_C2012, CA_C2016) sind in der Fettsäure-Biosynthese involviert und in einem großen Gen-Cluster lokalisiert (CA_C1988-CA_C2019). Bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität und induzierter Solventogenese konnte für die Gene *mmgB* und *fadB* eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass die Gene der Fettsäure-Biosynthese infolge steigender Butanol-Konzentrationen und dadurch verändernder Zellmembranen induziert werden. Gestützt wird diese Vermutung durch ähnliche Beobachtungen aus den Transkriptionsanalysen unter Butanol-Stress und in kontinuierlichen Chemostaten-Kulturen (Tomas, Beamish *et al.* 2004; Grimmeler, Janssen *et al.* 2011).

Transkriptionsanalysen unter Butanol-Stress zeigten darüber hinaus ein erhöhtes Expressionsverhalten des Sporulations-spezifischen Sigma Faktors F (CA_C2306) in Abhängigkeit des Sporulations-Regulators Spo0A (*spo0A*) (Tomas, Beamish *et al.* 2004). Bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität und bereits während des logarithmischen Wachstums konnten ebenfalls für die Gene der Sporulations-bezogenen Sigma Faktoren F und G (*sigF*, *sigG*), deren Verantwortung in der Kontrolle früher Sporulations-Ereignisse liegt (Tomas, Alsaker *et al.* 2003), eine signifikant verstärkte Expression nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass *C. acetobutylicum* als Reaktion auf die erhöhte Butanol-Konzentration und die vorzeitige Solventogenese, die Expression Sporulations-spezifischer Gene induziert um das Überleben der Zelle zu sichern.

Die steigende Butanol-Konzentration induziert des Weiteren die Synthese bekannter Stressproteine, wie z.B. den Hitzeschock-Proteinen (Terracciano and Kashket 1986). Hitzeschock-Proteine (HSP) spielen eine essentielle Rolle in der Synthese, des Transports und in der Faltung von Proteinen. In *C. acetobutylicum* erhöhte sich die Butanol-Toleranz mit der Überexpression des Hitzeschock-Proteins GroESL (Tomas,

Welker *et al.* 2003). Die Transkriptionsanalysen bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität zeigten erhöhte Genexpressionen einer Vielzahl von Hitzeschock-Proteinen (DnaK, DnaJ, GroEL, GroES, Hsp18). Mit der Induktion dieser Gene während erhöhter Butanol-Konzentrationen scheint *C. acetobutylicum* die Aggregation von Proteinen zu verhindern und die korrekte Protein-Faltung sicherzustellen. Ähnliche Expressionsdaten postulierten die Autoren um Tomas *et al.* unter Butanol-Stress. Die Gene einer Reihe von Hitzeschock-Proteinen zeigten während steigender Butanol-Konzentrationen sowohl im Überexpressions-Stamm 824(pGROE1) als auch im Kontrollstamm 824(pSOS95del) eine signifikant verstärkte Expression (Tomas, Beamish *et al.* 2004).

Im Rahmen einer Studie mit dem Cyanobacterium *Synechocystis* sp. zeigten Gene der Lipoproteine nach hyperosmotischem Stress eine erhöhte Expression (Kanesaki, Suzuki *et al.* 2002). Dabei fungieren einige Lipoproteine als eine Art Membran-Chaperon zur Unterbindung unproduktiver Wechselwirkungen mit der Zellwand (Wahlstrom, Vitikainen *et al.* 2003). Das Gen eines *Rare* Lipoproteins (CA_P0058) zeigte bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität eine signifikant erhöhte Expression. Unter dem Gesichtspunkt, dass erhöhte Butanol-Konzentration die Fluidität der Cytoplasma-Membran erhöhen, scheint *C. acetobutylicum* mit der Synthese dieses Lipoproteins die Zellstabilität aufrechtzuerhalten.

4.4 Mutagenese-Systeme in *C. acetobutylicum*

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Antisense-RNA Technologie eine effiziente Methode für die Reduzierung der Hydrogenase HydA Menge auf Translationsebene darstellt. Für die Mutationen einzelner Gene oder ganzer Genombereiche werden unterdessen mit den gerichteten und ungerichteten Mutagenese-Systemen einfache Methoden benötigt. Als Beispiel der gerichteten Mutagenese seien markerfreie Deletionssysteme zu nennen. Für die Etablierung markerfreier Deletionssysteme in *C. acetobutylicum* wurde im Zuge dieser Arbeit die Temperatursensitivität des Replikationsursprunges ori pE194^{ts} (Arnaud, Chastanet *et al.* 2004) und die Wirkungsweise der Uracil-Phosphoribosyltransferase näher untersucht. Darüber hinaus galt es, mit einer Transposonmutagenese, basierend auf

dem *mariner* Transposon TnYLB-1, erste Erkenntnisse über die ungerichtete Mutagenese in *C. acetobutylicum* zu erlangen.

Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*)

Für die genetische Manipulation von Prokaryonten wurde im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Markern für die Gegenselektion entwickelt. Unter Verwendung der Phosphoribosyltransferasen (PRTasen) konnten in verschiedenen Bakterien markerfreie Deletionssysteme etabliert werden (Spring, Mattick *et al.* 1994; Fukagawa, Hayward *et al.* 1999; Peck, DasSarma *et al.* 2000; Fabret, Ehrlich *et al.* 2002; Bitan-Banin, Ortenberg *et al.* 2003; Pritchett, Zhang *et al.* 2004; Kristich, Manias *et al.* 2005). Die PRTasen regenerieren freie Purine oder Pyrimidine über deren Umwandlung in ihre korrespondierenden Nukleotid-Monophosphate. PRTasen können mit Basenanaloga reagieren, woraufhin toxische Nukleotide entstehen. Mutanten der PRTasen unterbinden diesen toxischen Effekt und schaffen so die Basis einer Gegenselektion.

Die Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) ist eine dieser PRTasen. In *B. subtilis* und *E. faecalis* konnte unter Verwendung der Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) ein markerfreies Deletionssystem erfolgreich etabliert werden (Fabret, Ehrlich *et al.* 2002; Kristich, Manias *et al.* 2005).

Es stellt sich die Frage, ob dieses markerfreie Deletionssystem unter Verwendung der Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) auf *C. acetobutylicum* übertragen werden kann.

Für die Untersuchung dieser Fragestellung und die Verwendung von 5-Fluorouracil (5-FU) als Marker für die Gegenselektion war eine Modifikation des Ausgangsstammes notwendig. Das kodierende Gen der Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) musste durch eine *double cross-over* Rekombination deletiert werden. Für die Deletion des *upp*-Gens wurde zunächst der Deletionsvektor pMADK upp^- ori pE194^{ts} verwendet. Der Vektor trägt eine Deletion im Replikationsursprung ori pE194^{ts}, so dass eine Replikation in *C. acetobutylicum* ausgeschlossen ist. Die Verwendung von nicht-replikativen Integrationsvektoren beschränkte sich zunächst auf leicht zu transformierende Bakterien (Kieser and Hopwood 1991) (Chassy and Murphy, 1993; Perego, 1993). Die Etablierung einer effizienten Transformationsprozedur und das vermehrte Wissen über Gen-Strukturen und Funktionen ermöglichte indes die Verwendung von nicht-replikativen Integrationsvektoren in *C. acetobutylicum*

(Mermelstein and Papoutsakis 1993; Papoutsakis and Bennett 1993). So beruhen Integrations-Mutanten der Gene *pta*, *buk* und *aad* in *C. acetobutylicum* auf der Verwendung dieser Technologie (Green and Bennett 1996; Green, Boynton *et al.* 1996). Die Autoren um Green *et al.* berichteten ungeachtet dessen von einer sehr geringen Integrations-Effektivität der nicht-replikativen Vektoren in *C. acetobutylicum*. Mit 0,5 Mutanten pro μg transformierter nicht-replikativer Plasmid-DNA gelang die Insertion in viele weitere Gene jedoch nicht. Die Problematik in Bezug auf die Integrations-Effektivität von nicht-replikativen Vektoren in *C. acetobutylicum* konnte mit der Verwendung des Deletionsvektors pMADK upp^- ori pE194 $^{\text{ts-}}$ bestätigt werden. Trotz mehrerer Versuche konnte keine Integration des Vektors in das Genom von *C. acetobutylicum* nachgewiesen werden. Für die Untersuchung der Rekombinationseffizienz in *C. acetobutylicum* wurden aus diesem Grund verschiedene replikative Deletionsvektoren mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen und Orientierungen der Deletionskassette verwendet. Die Deletionsvektoren pMADK upp^- , pMADK upp^- II, pDK15 und pDK16 zeigten trotz verschiedener Inkubationszeiten bei 37°C und in Anwesenheit von Clarithromycin und Thymidin kein Rekombinationsereignis. Ähnliche Resultate konnten in parallelen Experimenten in Abwesenheit von Clarithromycin beobachtet werden. Es scheint, als sei die Rekombinationseffizienz in *C. acetobutylicum* unabhängig der Art der verwendeten Deletionsvektoren sehr gering.

Diese Vermutung wird teilweise von den Erkenntnissen um Harris *et al.* gestützt. Nach mehreren Versuchen eine Spo0A Mutante durch nicht-replikative Integrationsvektoren zu generieren, entwickelten sie eine Methode basierend auf einem replikativen Vektor. Zwar konnten sie eine Insertion in *spo0A* infolge eines unerwarteten *coss-over* zwischen 10 bp langen homologen Sequenzen nachweisen, doch blieb diese Methode bei vielen weiteren Versuchen Insertions-Mutanten zu erzeugen erfolglos (Harris, Welker *et al.* 2002).

Die Erkenntnisse dieser Arbeit und vorherigen Studien deuteten auf Unterschiede im Rekombinationsapparat von *C. acetobutylicum* hin. Untersuchungen in *E. coli* zeigten, dass *recA* eine essentielle Rolle in der homologen Rekombination einnimmt (Roca and Cox 1990; Roca and Cox 1997). Um die Rekombinationseffizienz in *C. acetobutylicum* zu steigern, wurden zusätzliche Kopien von *recA* in Form von pDK17 in den Organismus eingebracht. Die Rekombination des Vektors in das Chromosom blieb unterdessen erfolglos.

Es stellt sich die Frage, warum *C. acetobutylicum* über solch eine geringe Rekombinationseffizienz verfügt.

Ein Erklärungsansatz hierfür könnte in der geringen Transformationseffizienz liegen. Der DNA-Transfer in eine Vielzahl von Clostridien ist wenig effizient, wodurch die Integration eines Vektors infolge der homologen Rekombination erschwert wird. Die Entstehung der *double cross-over* Mutanten in *Clostridium perfringens* kann mit der hohen Frequenz, DNA in diesen Organismus zu transformieren, erklärt werden (Awad, Bryant *et al.* 1995; Bannam, Crellin *et al.* 1995).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die sehr geringe Rekombinationseffizienz könnte in der Rekombinations-Maschinerie von *C. acetobutylicum* begründet sein. Die homologe Rekombination ist ein *house keeping* Prozess, der in nahezu allen Organismen gleich ist (Fraser, Hanage *et al.* 2007). Die dafür benötigte Zellmaschinerie scheint jedoch nicht notwendigerweise konserviert zu sein. So zeigten Sequenzvergleiche zwischen *B. subtilis* und sechs verschiedenen Clostridien-Stämmen, dass u.a. *C. acetobutylicum* über kein Homolog zu *recU* aus *B. subtilis* verfügt (Tracy, B.P. Patent, 2009). Das Gen *recU* kodiert für eine Resolvase, die den genetischen Informationsaustausch zwischen homologen Sequenzen in einer Holliday-Struktur katalysiert. Die Bedeutung dieser Resolvase in Gram-positiven Organismen wird mit Deletionsmutanten dieses Gens deutlich. Diese weisen ein Defizit in der DNA-Reparatur und Rekombination auf (Fernandez, Sorokin *et al.* 1998; Carrasco, Cozar *et al.* 2004; Carrasco, Ayora *et al.* 2005). Es ist anzunehmen, dass das Fehlen von RecU Auswirkungen auf die Rekombination von *C. acetobutylicum* hat. Hinweise darauf liefern die Erkenntnisse der Autoren um Tracy *et al.* In Anwesenheit des *recU* Gens aus *B. subtilis* konnte die Funktionalität des Rekombinationssystems in *C. acetobutylicum* verbessert und folglich die Integrationseffizienz der Vektoren deutlich erhöht werden. Mit der Verwendung dieser Technologie erzeugten sie u.a. *spo0A* und *sigE* Mutanten in *C. acetobutylicum* (Tracy, B.P. Patent, 2009).

Temperatursensitivität des Replikationsursprunges ori pE194^{ts}

Die Etablierung markerfreier Deletionssysteme in den Stämmen *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* und *Bacillus cereus* basiert auf der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges ori pE194^{ts} (Arnaud, Chastanet *et al.* 2004). Die Temperatursensitivität geht dabei auf eine mutagenisierte Form des

Vektors pE194 zurück, in dessen Folge die Funktion der Replikation beeinflusst wird (Gryczan, Hahn *et al.* 1982; Villafane, Bechhofer *et al.* 1987).

Für die Untersuchung der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges ori pE194^{ts} in *C. acetobutylicum* stand der Vektor pKVM1 (Rachinger, 2010) zur Verfügung. Der Vektor ist ein Derivat des Plasmids pMAD (Arnaud, Chastanet *et al.* 2004) und verbindet einen einfachen konjugativen Transfer mit einem effizienten gerichteten Mutagensystem.

In einer vergleichenden Darstellung der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges ori pE194^{ts} zwischen den Stämmen *B. licheniformis* MW3 und *C. acetobutylicum* konnte gezeigt werden, dass die Inkubationstemperatur von 42°C die Replikation des Vektors pKVM1 in beiden Stämmen signifikant inhibiert wird (s. 3.4.2).

Es stellt sich jedoch die Frage, warum der prozentuale Anteil pKVM1 enthaltender Zellen/ml in Relation zur Gesamtzellzahl/ml in *B. licheniformis* MW3 bereits in den frühen Stadien des Wachstums unter nicht-replikativen Bedingungen sinkt, während der prozentuale Anteil pKVM1 enthaltender Zellen/ml in Relation zur Gesamtzellzahl/ml in *C. acetobutylicum* in den ersten 8 h Wachstum unter nicht-replikativen Bedingungen nahezu konstant bleibt.

Ein Erklärungsansatz könnte die Temperatursensitivität des Replikationsursprunges ori pE194^{ts} in den Organismen *B. licheniformis* MW3 und *C. acetobutylicum* liefern. Es scheint, als sei der Replikationsursprung ori pE194^{ts} in *B. licheniformis* MW3 im Vergleich zu *C. acetobutylicum* wesentlich temperatursensitiver. Als Folge dessen ist der Effekt der Temperatursensitivität bereits nach wenigen Stunden des Wachstums unter nicht-replikativen Bedingungen zu erkennen.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass die Replikation von pKVM1 in *C. acetobutylicum* erst nach mehr als 8 h des Wachstums inhibiert wird, scheint die Generationszeit des Organismus bei einer Inkubationstemperatur von 42°C zu sein. Für *C. acetobutylicum* konnte bei einer Inkubationstemperatur von 42°C eine Generationszeit von 2,54 h bestimmt werden. Im Gegensatz dazu, zeigte *B. licheniformis* MW3 mit 1,17 h eine deutliche geringere Generationszeit bei dieser Temperatur. Es ist zu vermuten, dass bei einer höheren Generationszeit die Segregation des Vektors pKVM1 in *C. acetobutylicum* verlangsamt wird und so der Effekt der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges ori pE194^{ts} erst zu einem späteren Zeitpunkt zu erkennen ist. Für den Vektor pE194^{ts}, von welchem das

Plasmid pKVM1 abgeleitet ist, konnte bei einer Temperatur von 32°C eine Kopienzahl von 10 Plasmiden pro Zelle in *B. subtilis* nachgewiesen werden (Villafane, Bechhofer *et al.* 1987). Unter dem Gesichtspunkt, dass jede Zelle von *C. acetobutylicum* zu Beginn des Wachstums bei einer Temperatur von 42°C eine vergleichbare Kopienzahl von 10 Plasmiden pKVM1 pro Zelle aufweist und die Generationszeit 2,54 h beträgt, benötigt der Organismus nahezu 8,44 h ($\log_2(10) * g$), bis die ersten Zellen keine Kopie des Vektors pKVM1 aufweisen und der Effekt der Temperatursensitivität des Replikationsursprunges ori pE194^{ts} zu erkennen ist. Gestützt wird diese Theorie durch den sinkenden Anteil pKVM1 enthaltender Zellen nach 8 h des Wachstums und die Tatsache, dass nach 23 h keine pKVM1 enthaltenden Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Replikationsursprunges ori pE194^{ts} über eine Temperatursensitivität von 42°C in *C. acetobutylicum* verfügt und die Replikation des Vektors pKVM1 inhibiert.

***mariner* Transposonmutagenese in Anwesenheit eines Reporter-Vektors**

Für die Generierung einer Bibliothek von zufällig inserierten Transposon-Mutanten in das Chromosom von *C. acetobutylicum* sollte eine Transposonmutagenese basierend auf dem *mariner* Transposon TnYLB-1 etabliert werden. Die Identifizierung der Transposon-Mutanten sollte auf der Verwendung eines Reporter-Vektors basieren. Reportergene dienen in der Gentechnologie dazu, Genexpressionen bestimmter Proteine anzuzeigen oder im Zuge der Transposonmutagenese spezielle Insertionsmutanten zu identifizieren.

In *C. perfringens* konnten zwei verschiedene Reportergene erfolgreich eingesetzt werden. Das kodierende Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (*catP*) vermittelte dem Organismus eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol (Steffen and Matzura 1989). Ein weiteres Reportersystem in *C. perfringens* beruhte auf dem kodierenden Gen des Luciferase Enzyms aus *Vibrio fischeri* (Phillips-Jones 1993; Phillips-Jones 2000). Die Luciferase katalysiert die Produktion von Licht ausgehend von FMNH₂ und langkettigen aliphatischen Aldehyden. Für diese Reaktion ist jedoch Sauerstoff von Nöten, so dass das Reportersystem lediglich in aeroben und fakultativen anaeroben Organismen weit verbreitet ist (Stewart and Williams 1992).

Die Entwicklung eines Reportersystems in dem strikt anaeroben Organismus *C. acetobutylicum* basierte auf den Proteinen der Serie evoglow[®] der Firma evocatal GmbH (Düsseldorf, Deutschland). Die Proteine benötigen im Gegensatz zu anderen „Grün-fluoreszierenden Proteinen“ (GFP) und ihren Varianten für die Ausbildung ihrer fluorophoren Gruppe keinerlei Sauerstoff. Diese Fähigkeit wird für die Entwicklung von anaeroben Reportersystemen genutzt.

Anhand der Transkriptionsanalysen von Chemostaten-Kulturen aus *C. acetobutylicum* ist bekannt, dass das kodierende Gen der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) eine signifikant verstärkte Expression in der Solventogenese zeigt (Grimmler, Janssen *et al.* 2011). Für die Identifizierung von Transposon-Mutanten, dessen Gene oder Proteine die Solventogenese in *C. acetobutylicum* direkt beeinflussen, wurden die Vektoren pDK4, pDK5 und pDK6 konstruiert. Sie enthalten eine Fusion des Promotors von *adc* mit den evoglow[®] Proteinen aus *Pseudomonas putida* und *B. subtilis*. Untersuchungen im Transilluminator zeigten, dass die Proteine auf Basis der Vektoren in *C. acetobutylicum* schwach fluoreszierten. Es besteht die Vermutung, dass die Stärke der Fluoreszenz von der Sporulation und dem vegetativen Zustand der Zellen abhängt. Die Sporenhülle scheint die sichtbare Fluoreszenz der Proteine zu verhindern.

Die Transposonmutagenese basierend auf dem *mariner* Transposon konnte bereits in einer Vielzahl von Bakterien etabliert werden (Rubin, Akerley *et al.* 1999; Pelicic, Morelle *et al.* 2000; Wong and Mekalanos 2000; Guo and Mekalanos 2001; Sassetti, Boyd *et al.* 2001; Lamichhane, Zignol *et al.* 2003; Youderian, Burke *et al.* 2003; Bourhy, Louvel *et al.* 2005; Le Breton, Mohapatra *et al.* 2006; Cartman and Minton 2010). Die Selektion der Transposon-Mutanten ausgehend von dem Vektor pMarA (Le Breton, Mohapatra *et al.* 2006) beruht auf dem Antibiotikum Kanamycin. Anaerobier besitzen eine intrinsische Resistenz gegenüber den Aminoglycosiden Streptomycin, Kanamycin und Gentamycin (Ellen von Czapiewski, 2010). Aus diesem Grund sollte das Antibiotika-Resistenzgen von Kanamycin gegen jene von Chloramphenicol oder Tetracyclin (s. Tabelle 3.6) ausgetauscht werden. Unter Verwendung der verschiedensten Klonierungs-Strategien und -Möglichkeiten gelang es jedoch nicht, die Antibiotika-Resistenzgene von Chloramphenicol oder Tetracyclin in das *mariner* Transposons TnYLB-1 zu klonieren. Dabei wurde auf die Insertion von Restriktionsschnittstelle via GeneSOEing-PCR (s. 2.6.3), die Hybridisierung von DNA-Fragmenten (s. 2.4.3.4) und die Subklonierung via

„TOPO-TA“-Klonierung der Firma Invitrogen zurückgegriffen. Es ist vermuten, dass die Klonierung der Chloramphenicol oder Tetracyclin Antibiotika-Resistenzgene durch den *cut and paste* Mechanismus des Transposons erschwert wird.

4.5 Ausblick

Mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität zeigten an der Solventogenese beteiligte Gene eine erhöhte Expression. Die Bildung der Lösungsmittel Ethanol und Butanol ist von NADH abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Wege der Reduktion von NADH durch reduziertes Ferredoxin diskutiert. Es gilt, das Gen der Ferredoxin-NAD⁺-Reduktase zu identifizieren und falls dieses existiert, die Funktion des Proteins näher zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte die explizite Funktion der FAD/FMN-enthaltende Dehydrogenase mit den EtfAB Komponenten (CA_C2544-CA_C2542) aufgeklärt und einen möglichen Zusammenhang zu einem globalen Redox-Regulator untersucht werden.

Das markerfreie Deletionssystem unter Verwendung der Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) offenbarte eine Problematik seitens der homologen Rekombination. Für die Optimierung der Rekombinationseffizienz gilt es, einen Vektor mit einer Kombination aus temperatursensitivem Replikationsursprung ori pE194^{ts}, der Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) und einer Resolvase aus *B. subtilis* (*recU*) zu konstruieren.

5. Zusammenfassung

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 generiert seine Energie durch Fermentation. Für die Optimierung seiner Energie-Produktion ist der Organismus bemüht, einen Großteil seiner Reduktionsäquivalente wie reduziertes Ferredoxin in Form von H₂ abzugeben. Die Hydrogenase HydA nimmt dabei eine entscheidende Rolle in der H₂-Produktion ein.

Mit der Antisense-RNA Technologie konnte im Rahmen dieser Arbeit die Proteinmenge der Hydrogenase HydA auf Translationsebene reduziert werden. Dabei ist die Proteinmenge der limitierende Faktor für die Aktivität des Enzyms. In den Stämmen *Clostridium acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 konnte eine signifikante Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität und daraus resultierend der H₂-Produktion nachgewiesen werden. Die Hydrogenase HydA scheint zudem ein Schlüsselenzym in der Produktselektivität von *C. acetobutylicum* zu sein. Mit der Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität konnte in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 eine vermehrte Produktion der Lösungsmittel Aceton, Ethanol und Butanol bei gleichzeitiger Konzentrations-Abnahme der produzierten Säuren Acetat und Butyrat nachgewiesen werden. Das veränderte Fermentationsverhalten korrelierte mit den Expressionsdaten aus den Transkriptionsanalysen, basierend auf DNA-Microarrays. Die Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität verursachte vermutlich ein sogenanntes *bottleneck* des Kohlenstoff-Flusses der Zelle an der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase. Für die Beseitigung des Kohlenstoff-Staus konnten erhöhte Genexpressionen der Pyruvat-Decarboxylase und der L-Laktat-Dehydrogenase bei reduzierter Hydrogenase Aktivität nachgewiesen werden. Die Reduktion der Hydrogenase HydA Aktivität hatte zudem offenbar Folgen für den Elektronen-Fluss in *C. acetobutylicum*. In den Transkriptionsanalysen konnten für die Gene der NADH-abhängigen Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (*adhE1*) und der Butanol-Dehydrogenase (*bdhB*) erhöhte Expressionen bei reduzierter Hydrogenase HydA Aktivität ermittelt werden. Ein ähnliches Expressionsverhalten zeigten die Gene der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) und der CoA-Transferase (*ctfA*, *ctfB*) unter letztgenannter Bedingung.

Mit der Modifikation von Enzymen durch die Antisense-RNA Technologie richtete sich das Interesse im Folgenden auf die einfache genetische Manipulation in

C. acetobutylicum. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem, unter Verwendung eines Uracil-Phosphoribosyltransferase-basierten markerfreien Deletionssystems, auf die Problematik seitens der Rekombinationseffizienz in *C. acetobutylicum* aufmerksam gemacht werden. Für die verschiedenen konstruierten Deletionsvektoren gelang es trotz vielen Versuchen nicht, ein Rekombinationsereignis in *C. acetobutylicum* nachzuweisen.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, M. W.** (1990). "The structure and mechanism of iron-hydrogenases." Biochim Biophys Acta **1020**(2): 115-145.
- Alsaker, K. V. and E. T. Papoutsakis** (2005). "Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*." J Bacteriol **187**(20): 7103-7118.
- Alwine, J. C., D. J. Kemp, et al.** (1977). "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5350-5354.
- Andersch W., H. Bahl and G. Gottschalk** (1982). "Acetone-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in an ammonium-limited chemostat at low pH values". Biotechnol. Lett. **4**: 29-32
- Andre, G., S. Even, et al.** (2008). "S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium acetobutylicum*." Nucleic Acids Res **36**(18): 5955-5969.
- Arnaud, M., A. Chastanet, et al.** (2004). "New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria." Appl Environ Microbiol **70**(11): 6887-6891.
- Awad, M. M., A. E. Bryant, et al.** (1995). "Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene." Mol Microbiol **15**(2): 191-202.
- Baer, S. H., H. P. Blaschek, et al.** (1987). "Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*." Appl Environ Microbiol **53**(12): 2854-2861.
- Baer, S. H., D. L. Bryant, et al.** (1989). "Electron Spin Resonance Analysis of the Effect of Butanol on the Membrane Fluidity of Intact Cells of *Clostridium acetobutylicum*." Appl Environ Microbiol **55**(10): 2729-2731.
- Bahl H., W. Andersch and G. Gottschalk** (1982). "Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat". Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **15**: 201-205 (Erratum 17: 73; 1983).
- Bahl H. and G. Gottschalk** (1984). "Parameters affecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture". Biotechnol. Bioeng. Symp. **14**: 215-223.

- Bahl, H., M. Gottwald, et al.** (1986). "Nutritional Factors Affecting the Ratio of Solvents Produced by *Clostridium acetobutylicum*." Appl Environ Microbiol **52**(1): 169-172.
- Bannam, T. L. and J. I. Rood** (1993). "*Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants." Plasmid **29**(3): 233-235.
- Bannam, T. L., P. K. Crellin, et al.** (1995). "Molecular genetics of the chloramphenicol-resistance transposon Tn4451 from *Clostridium perfringens*: the TnpX site-specific recombinase excises a circular transposon molecule." Mol Microbiol **16**(3): 535-551.
- Behrens, S., W. Mitchell, et al.** (2001). "Molecular analysis of the mannitol operon of *Clostridium acetobutylicum* encoding a phosphotransferase system and a putative PTS-modulated regulator." Microbiology **147**(Pt 1): 75-86.
- Benemann, J.** (1996). "Hydrogen biotechnology: progress and prospects." Nat Biotechnol **14**(9): 1101-1103.
- Bentley, R.** (1990). "The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches." Crit Rev Biochem Mol Biol **25**(5): 307-384.
- Biegel, E. and V. Müller** (2011). "A Na⁺-translocating pyrophosphatase in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*." J Biol Chem **286**(8): 6080-6084.
- Biegel, E., S. Schmidt, et al.** (2011). "Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes." Cell Mol Life Sci **68**(4): 613-634.
- Bitan-Banin, G., R. Ortenberg, et al.** (2003). "Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene." J Bacteriol **185**(3): 772-778.
- Blokesch, M., S. P. Albracht, et al.** (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**(1): 155-167.
- Blokesch, M., A. Paschos, et al.** (2002). "Metal insertion into NiFe-hydrogenases." Biochem Soc Trans **30**(4): 674-680.
- Blusson, H., H. Petitdemange, et al.** (1981). "A new, fast, and sensitive assay for NADH--ferredoxin oxidoreductase detection in clostridia." Anal Biochem **110**(1): 176-181.
- Borden, J. R. and E. T. Papoutsakis** (2007). "Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum*." Appl Environ Microbiol **73**(9): 3061-3068.

- Bourhy, P., H. Louvel, et al.** (2005). "Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon." J Bacteriol **187**(9): 3255-3258.
- Bowien, B. and H. G. Schlegel** (1981). "Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria." Annu Rev Microbiol **35**: 405-452.
- Bowles K.L. and Ellefson L.W.** (1985). "Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*." Appl. Environ. Microbiol. **50**: 1165-1170.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix** (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." J Mol Biol **41**(3): 459-472.
- Boynton, Z. L., G. N. Bennet, et al.** (1996). "Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." J Bacteriol **178**(11): 3015-3024.
- Boynton, Z. L., G. N. Bennett, et al.** (1996). "Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl Environ Microbiol **62**(8): 2758-2766.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brekasis, D. and M. S. Paget** (2003). "A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." EMBO J **22**(18): 4856-4865.
- Brückner, R. and F. Titgemeyer** (2002). "Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization." FEMS Microbiol Lett **209**(2): 141-148.
- Buckel, W., B. M. Martins, et al.** (2005). "Radical-mediated dehydration reactions in anaerobic bacteria." Biol Chem **386**(10): 951-959.
- Bunday Z., J. C. Linden and M. N. Karim** (1989). "Improved acetone-butanol fermentation analysis using subambient HPLC column temperature". Enzyme Microbial Technol. **12**: 24-27.
- Cartman, S. T. and N. P. Minton** (2010). "A mariner-based transposon system for in vivo random mutagenesis of *Clostridium difficile*." Appl Environ Microbiol **76**(4): 1103-1109.
- Cary, J. W., D. J. Petersen, et al.** (1988). "Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* phosphotransbutyrylase and butyrate kinase genes in *Escherichia coli*." J Bacteriol **170**(10): 4613-4618.

- Carrasco, B., M. C. Cozar, et al.** (2004). "Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of Holliday junction processing functions in chromosome segregation." J Bacteriol **186**(17): 5557-5566.
- Carrasco, B., S. Ayora, et al.** (2005). "*Bacillus subtilis* RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities." Nucleic Acids Res **33**(12): 3942-3952.
- Chapman-Smith, A. and J. E. Cronan, Jr.** (1999). "The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity." Trends Biochem Sci **24**(9): 359-363.
- Chassy, B. M. & Murphy, C. M.** (1993). "*Lactococcus* and *Lactobacillus*. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria": Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, pp. 615-624. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Choi, K. H., R. J. Heath, et al.** (2000). "beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis." J Bacteriol **182**(2): 365-370.
- Chiao, J. S. and Z. H. Sun** (2007). "History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: development of continuous production technology." J Mol Microbiol Biotechnol **13**(1-3): 12-14.
- Coleman, J., P. J. Green, et al.** (1984). "The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes." Cell **37**(2): 429-436.
- Cooksley, C. M., I. J. Davis, et al.** (2010). "Regulation of neurotoxin production and sporulation by a Putative agrBD signaling system in proteolytic *Clostridium botulinum*." Appl Environ Microbiol **76**(13): 4448-4460.
- Cornillot, E., R. V. Nair, et al.** (1997). "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**(17): 5442-5447.
- Czapiewski, Ellen von** (2010): „Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen mit dem Verfahren der Bouillon-Mikrodilution bei pathogenen Bakterien von Fischen und molekulare Charakterisierung von Resistenzgenen“ Dissertation.
- Daruwala, R., D. K. Bhattacharyya, et al.** (1997). "Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: overexpression, purification, and characterization of a new isochorismate synthase from *Escherichia coli*." J Bacteriol **179**(10): 3133-3138.
- Datta, R. and J. G. Zeikus** (1985). "Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids." Appl Environ Microbiol **49**(3): 522-529.

- Demuez, M., L. Cournac, et al.** (2007). "Complete activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners." FEMS Microbiol Lett **275**(1): 113-121.
- Desai, R. P. and E. T. Papoutsakis** (1999). "Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*." Appl Environ Microbiol **65**(3): 936-945.
- Doremus, M. G., J. C. Linden, et al.** (1985). "Agitation and pressure effects on acetone-butanol fermentation." Biotechnol Bioeng **27**(6): 852-860.
- Drapal, N. and A. Böck** (1998). "Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation." Biochemistry **37**(9): 2941-2948.
- Dürre P.** (1998). "New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation". Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 639-648.
- Dürre P.** (2005). "Formation of solvents in Clostridia". In: Handbook on Clostridia. Dürre P. (Hrsg). S. 673-695. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA
- Dürre, P.** (2007). "Biobutanol: an attractive biofuel." Biotechnol J **2**(12): 1525-1534.
- Dürre, P.** (2008). "Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel." Ann N Y Acad Sci **1125**: 353-362.
- Dürre, P., M. Bohringer, et al.** (2002). "Transcriptional regulation of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*." J Mol Microbiol Biotechnol **4**(3): 295-300.
- Dürre, P., R. J. Fischer, et al.** (1995). "Solventogenic enzymes of *Clostridium acetobutylicum*: catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation." FEMS Microbiol Rev **17**(3): 251-262.
- Ehammer, H., G. Rauch, et al.** (2007). "Conservation of NADPH utilization by chorismate synthase and its implications for the evolution of the shikimate pathway." Mol Microbiol **65**(5): 1249-1257.
- Erbes, D. L., D. King, et al.** (1979). "Inactivation of Hydrogenase in Cell-free Extracts and Whole Cells of *Chlamydomonas reinhardi* by Oxygen." Plant Physiol **63**(6): 1138-1142.
- Ezeji, T. C., P. M. Karcher, et al.** (2005). "Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation." Bioprocess Biosyst Eng **27**(3): 207-214.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi, et al.** (2004). "Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations." Chem Rec **4**(5): 305-314.

- Fabret, C., S. D. Ehrlich, et al.** (2002). "A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **46**(1): 25-36.
- Fawcett, P., P. Eichenberger, et al.** (2000). "The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8063-8068.
- Fernandez, S., A. Sorokin, et al.** (1998). "Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effects of *recU* and *recS* mutations on DNA repair and homologous recombination." J Bacteriol **180**(13): 3405-3409.
- Feucht, A., I. Lucet, et al.** (2001). "Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **40**(1): 115-125.
- Figurski, D. H. and D. R. Helinski** (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1648-1652.
- Fischer, R. J., J. Helms, et al.** (1993). "Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis." J Bacteriol **175**(21): 6959-6969.
- Fitzpatrick, J. M., D. A. Johnston, et al.** (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): 1-13.
- Fontaine, L., I. Meynial-Salles, et al.** (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**(3): 821-830.
- Fraser, C., W. P. Hanage, et al.** (2007). "Recombination and the nature of bacterial speciation." Science **315**(5811): 476-480.
- Freier D. and Gottschalk G.** (1987). "L(+)-lactate dehydrogenase of *Clostridium acetobutylicum* is activated by 1,6-bis-phosphate." FEMS Microbiol. Lett. **43**: 229-233
- Frey, M.** (2002). "Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes." ChemBiochem **3**(2-3): 153-160.
- Fukagawa, T., N. Hayward, et al.** (1999). "The chicken HPRT gene: a counter selectable marker for the DT40 cell line." Nucleic Acids Res **27**(9): 1966-1969.
- Fuqua, W. C., S. C. Winans, et al.** (1994). "Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators." J Bacteriol **176**(2): 269-275.

- Gabriel C. L.** (1928). Butanol fermentation process. Ind. Eng. Chem. 20: 1063-1067.
- Gerischer, U. and P. Dürre** (1992). "mRNA analysis of the *adc* gene region of *Clostridium acetobutylicum* during the shift to solventogenesis." J Bacteriol 174(2): 426-433.
- Gheshlaghi, R., J. M. Scharer, et al.** (2009). "Metabolic pathways of clostridia for producing butanol." Biotechnol Adv 27(6): 764-781.
- Girbal, L. and P. Soucaille** (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(21): 6433-6438.
- Girbal, L., I. Vasconcelos, et al.** (1994). "Transmembrane pH of *Clostridium acetobutylicum* is inverted (more acidic inside) when the in vivo activity of hydrogenase is decreased." J Bacteriol 176(19): 6146-6147.
- Girbal, L., C. Croux, I. Vasconcelos, and P. Soucaille** (1995). "Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824". FEMS Microbiol. Rev. 17:287-297.
- Girbal, L., I. Vasconcelos, and P. Soucaille** (1995). "How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH". FEMS Microbiol. Rev., in press.
- Gonzalez-Pajuelo, M., I. Meynial-Salles, et al.** (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(1): 96-101.
- Gorwa, M. F., C. Croux, et al.** (1996). "Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." J Bacteriol 178(9): 2668-2675.
- Gottschal J. C. and J. G. Morris** (1981). "The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate". FEMS Microbiol. Lett. 12: 385-389.
- Gould, I. M.** (2000). "Towards a common susceptibility testing method?" J Antimicrob Chemother 45(6): 757-762.
- Gray, C. T. and H. Gest** (1965). "Biological Formation of Molecular Hydrogen." Science 148(3667): 186-192.
- Green, E. M. and G. N. Bennett** (1996). "Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl Biochem Biotechnol 57-58: 213-221.

- Green, E. M., Z. L. Boynton, et al.** (1996). "Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Microbiology **142** (Pt 8): 2079-2086.
- Grimmler, C., C. Held, et al.** (2010). "Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of D-glucose and D-xylose." J Biotechnol **150**(3): 315-323.
- Grimmler, C., H. Janssen, et al.** (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): 1-15.
- Grupe, H. and G. Gottschalk** (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**(12): 3896-3902.
- Gryczan, T. J., J. Hahn, et al.** (1982). "Replication and incompatibility properties of plasmid pE194 in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **152**(2): 722-735.
- Guerrini, O., B. Burlat, et al.** (2008). "Characterization of two 2[4Fe4S] ferredoxins from *Clostridium acetobutylicum*." Curr Microbiol **56**(3): 261-267.
- Guo, B. P. and J. J. Mekalanos** (2001). "*Helicobacter pylori* mutagenesis by mariner in vitro transposition." FEMS Immunol Med Microbiol **30**(2): 87-93.
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Hanson, A. M. and N. E. Rodgers** (1946). "Influence of iron concentration and attenuation on the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*." J Bacteriol **51**: 568.
- Harris, L. M., N. E. Welker, et al.** (2002). "Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." J Bacteriol **184**(13): 3586-3597.
- Harwood, Colin R., and Simon M. Cutting.** "Molecular Biological Methods for *Bacillus*", Wiley, 1990.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, et al.** (2007). "The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*." J Microbiol Methods **70**(3): 452-464.
- Heckman, K. L. and L. R. Pease** (2007). "Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension." Nat Protoc **2**(4): 924-932.
- Herrmann, G., E. Jayamani, et al.** (2008). "Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria." J Bacteriol **190**(3): 784-791.

- Hillmann, F., C. Doring, et al.** (2009). "The role of PerR in O₂-affected gene expression of *Clostridium acetobutylicum*." J Bacteriol **191**(19): 6082-6093.
- Hippe, H., Andreesen, J.R., Gottschalk, G.** (1992): The genus *Clostridium* – Nonmedical 3rd edition. In The Prokaryotes, 2. Aufl., 1800-66; Hrsg. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H.; Springer Verlag, New York.
- Holt, R. A., G. M. Stephens, et al.** (1984). "Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH." Appl Environ Microbiol **48**(6): 1166-1170.
- Hongo, M.** (1958). "Change of solvent ratio by the addition of neutral red in the fermentation of pentose". Nippon Nogeikagaku Kaishi 32:219–223.
- Hönicke, D., H. Janssen, et al.** (2012). "Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol:acetone ratios." N Biotechnol.
- Horton, R. M., H. D. Hunt, et al.** (1989). "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension." Gene **77**(1): 61-68.
- Hüsemann M. H. W. and E. T. Papoutsakis** (1986). "Effect of acetoacetate, butyrate, and uncoupling ionophores on growth and product formation of *Clostridium acetobutylicum*". Biotechnol. Lett. 8: 37-42.
- Hussy, I., F. R. Hawkes, et al.** (2003). "Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora." Biotechnol Bioeng **84**(6): 619-626.
- Imlay, J. A.** (2006). "Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen." Mol Microbiol **59**(4): 1073-1082.
- Ingram, L. O.** (1976). "Adaptation of membrane lipids to alcohols." J Bacteriol **125**(2): 670-678.
- Janssen, P. J., D. T. Jones, et al.** (1990). "Studies on *Clostridium acetobutylicum* *glnA* promoters and antisense RNA." Mol Microbiol **4**(9): 1575-1583.
- Jewell J. B., J. B. Coutinho and A. M. Kropinski** (1986). "Bioconversion of propionic, valeric, and 4-hydroxybutyric acids into the corresponding alcohols by *Clostridium acetobutylicum* NRRL 527". Curr. Microbiol. 13: 215-219.
- Jones, D. T. and D. R. Woods** (1986). "Acetone-butanol fermentation revisited." Microbiol Rev **50**(4): 484-524.
- Jones, S. W., C. J. Paredes, et al.** (2008). "The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation." Genome Biol **9**(7): R114.

- Junelles M.A., Idrissi-Janati R., Petitedemange H., Gay R.** (1988). "Iron effect on acetone-butanol fermentation." *Current Microbiol.* 17: 299-303.
- Jungermann, K., R. K. Thauer, et al.** (1973). "Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic Clostridia." *Biochim Biophys Acta* **305**(2): 268-280.
- Kammler, M., C. Schön, et al.** (1993). "Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **175**(19): 6212-6219.
- Kanesaki, Y., I. Suzuki, et al.** (2002). "Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(1): 339-348.
- Kemp, J. T., A. Driks, et al.** (2002). "FtsA mutants of *Bacillus subtilis* impaired in sporulation." *J Bacteriol* **184**(14): 3856-3863.
- Kernodle, D. S., R. K. Voladri, et al.** (1997). "Expression of an antisense *hla* fragment in *Staphylococcus aureus* reduces alpha-toxin production *in vitro* and attenuates lethal activity in a murine model." *Infect Immun* **65**(1): 179-184.
- Khandekar, S. S., D. R. Gentry, et al.** (2001). "Identification, substrate specificity, and inhibition of the *Streptococcus pneumoniae* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH)." *J Biol Chem* **276**(32): 30024-30030.
- Kieser, T. and D. A. Hopwood** (1991). "Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement." *Methods Enzymol* **204**: 430-458.
- Kim, B. H., P. Bellows, et al.** (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**(4): 764-770.
- King, P. W., M. C. Posewitz, et al.** (2006). "Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system." *J Bacteriol* **188**(6): 2163-2172.
- Klein C.M.** (2009). "Molekulargenetische und reaktionskinetische Untersuchungen nativer und rekombinanter saccharolytischer Clostridien zur Optimierung der biologischen Wasserstoffproduktion." Dissertation (Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH, Aachen)
- Knappe, J., F. A. Neugebauer, et al.** (1984). "Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(5): 1332-1335.
- Köpke, M., C. Held, et al.** (2010). "*Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29): 13087-13092.

- Kristich, C. J., D. A. Manias, et al.** (2005). "Development of a method for markerless genetic exchange in *Enterococcus faecalis* and its use in construction of a *srtA* mutant." Appl Environ Microbiol **71**(10): 5837-5849.
- Kyazze, G., N. Martinez-Perez, et al.** (2006). "Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production." Biotechnol Bioeng **93**(5): 971-979.
- Lamichhane, G., M. Zignol, et al.** (2003). "A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7213-7218.
- Lampe, D. J., M. E. Churchill, et al.** (1996). "A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro." EMBO J **15**(19): 5470-5479.
- Lampe, D. J., T. E. Grant, et al.** (1998). "Factors affecting transposition of the Himar1 mariner transposon in vitro." Genetics **149**(1): 179-187.
- Larsson, J. T., A. Rogstam, et al.** (2005). "Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*." Microbiology **151**(Pt 10): 3323-3335.
- Laurinavichene, T. V., S. N. Kosourov, et al.** (2008). "Prolongation of H₂ photoproduction by immobilized, sulfur-limited *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." J Biotechnol **134**(3-4): 275-277.
- Lay, J.J., Lee, Y.J., Noike, T.** (1999): "Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste". Water Res. **33**: 2579-86.
- Le Breton, Y., N. P. Mohapatra, et al.** (2006). "In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon." Appl Environ Microbiol **72**(1): 327-333.
- Lederberg, E. M. and S. N. Cohen** (1974). "Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid." J Bacteriol **119**(3): 1072-1074.
- Lee, S., Park J., Jang S., Nielsen L., Kim J., Jung K.** (2008). "Fermentative butanol production by clostridia." Biotechnol. and Bioeng. **101**: 209-228.
- Lee, K. S., J. F. Wu, et al.** (2004). "Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor." Biotechnol Bioeng **87**(5): 648-657.
- Leonardo, M. R., P. R. Cunningham, et al.** (1993). "Anaerobic regulation of the adhE gene, encoding the fermentative alcohol dehydrogenase of *Escherichia coli*." J Bacteriol **175**(3): 870-878.

- Li, F., J. Hinderberger, et al.** (2008). "Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*." J Bacteriol **190**(3): 843-850.
- Lin, Y. L. and H. P. Blaschek** (1984). "Transformation of Heat-Treated *Clostridium acetobutylicum* Protoplasts with pUB110 Plasmid DNA." Appl Environ Microbiol **48**(4): 737-742.
- Lindblad, P., Kristensson, K., Lindberg, P., Federov, A., Pinto, F., Tsygankov, A.** (2002): Photoproduction of H₂ by wildtype *Anabaena* PCC 7120 and a hydrogen uptake deficient mutant: from laboratory experiments to outdoor culture. Int. J. Hydrogen Energy **27**: 1271-81.
- Lutz, S., A. Jacobi, et al.** (1991). "Molecular characterization of an operon (hyp) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **5**(1): 123-135.
- Massey, V.** (2000). "The chemical and biological versatility of riboflavin." Biochem Soc Trans **28**(4): 283-296.
- Meinecke, B., J. Bertram, et al.** (1989). "Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*." Arch Microbiol **152**(3): 244-250.
- Mermelstein, L. D., N. E. Welker, et al.** (1992). "Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Biotechnology (N Y) **10**(2): 190-195.
- Mermelstein, L. D. and E. T. Papoutsakis** (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**(4): 1077-1081.
- Meyer, C. L., J. W. Roos, and E. T. Papoutsakis** (1986). "Carbon monoxide gasing leads to alcohol production and butyrate uptake without acetone formation in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*". Appl. Microbiol. Biotechnol. **24**:159-167.
- Meyer, J.** (2000). "Clostridial iron-sulphur proteins." J Mol Microbiol Biotechnol **2**(1): 9-14.
- Mitchell, W. J.** (1998). "Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia." Adv Microb Physiol **39**: 31-130.
- Mitchell, W. J., J. E. Shaw, et al.** (1991). "Properties of the glucose phosphotransferase system of *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052." Appl Environ Microbiol **57**(9): 2534-2539.

- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Noike, T.** (2000): "Enhancement of hydrogen production from Glucose by nitrogen gas sparging". Bioresour. Technol. 73: 59-65.
- Molle, V., M. Fujita, et al.** (2003). "The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol 50(5): 1683-1701.
- Montet, Y., P. Amara, et al.** (1997). "Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics." Nat Struct Biol 4(7): 523-526.
- 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. and F. A. Faloona** (1987). "Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol 155: 335-350.
- Nair, R. V. and E. T. Papoutsakis** (1994). "Expression of plasmid-encoded aad in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production." J Bacteriol 176(18): 5843-5846.
- Nakayama, S., T. Kosaka, et al.** (2008). "Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster *hupCBA* in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4." Appl Microbiol Biotechnol 78(3): 483-493.
- Nakotte, S., S. Schaffer, et al.** (1998). "Electroporation of, plasmid isolation from and plasmid conservation in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792." Appl Microbiol Biotechnol 50(5): 564-567.
- Neuhard, J.** (1983) "Utilization of preformed pyrimidine bases and nucleosides". In Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms. Munch- Petersen, A. (eds). New York: Academic Press, pp. 95-148.
- Nicolet, Y., A. L. de Lacey, et al.** (2001). "Crystallographic and FTIR spectroscopic evidence of changes in Fe coordination upon reduction of the active site of the Fe-only hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*." J Am Chem Soc 123(8): 1596-1601.
- Nicolet, Y., B. J. Lemon, et al.** (2000). "A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases." Trends Biochem Sci 25(3): 138-143.
- Nicolet, Y., C. Piras, et al.** (1999). "*Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center." Structure 7(1): 13-23.
- Nielsen, A.T., Amandusson, H., Bjorklund, R., Dannetun, H., Ejlertsson, J., Ekedahl, L.G., Lundström, I., Svensson, B.H.** (2001): "Hydrogen production from organic waste". Int. J. Hydrogen Energy 26: 547-50.

- Noack S., Köpke M., Dürre P.** (2009). "Microbially produced fuels and other biofuels." In: New research on biofuels (Ed.: Wright, H.J. und Evans, A.D.), Nova Science Publishers, Hauppauge, NY (USA)
- Noike, T., Mizuno, O.** (2000): "Hydrogen fermentation of organic municipal wastes". Water Sci. Technol. 42: 155-62.
- Nölling, J., G. Breton, et al.** (2001). "Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*." J Bacteriol 183(16): 4823-4838.
- Novick, R. P.** (2003). "Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence." Mol Microbiol 48(6): 1429-1449.
- Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, et al.** (1985). "DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: structural relatedness and gene expression." Gene 35(1-2): 143-150.
- Nygaard, P.** (1993) "Purine and pyrimidine salvage pathways. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria": Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics.
- Ounine, K., H. Petitdemange, et al.** (1985). "Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*." Appl Environ Microbiol 49(4): 874-878.
- Papoutsakis, E. T.** (1983). "A useful equation for fermentations of butyric acid bacteria". The acetone-butanol fermentation and related topics, p. 121-126. In J. D. Bu'Lock and A. J. Bu'Lock (ed.), Science and technology letters. Kew, Surrey, United Kingdom.
- Papoutsakis, E. T. and G. N. Bennett** (1993). "Cloning, structure, and expression of acid and solvent pathway genes of *Clostridium acetobutylicum*." Biotechnology 25: 157-199.
- Paredes, C. J., K. V. Alsaker, et al.** (2005). "A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology." Nat Rev Microbiol 3(12): 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.
- Payne, M. J., A. Chapman, et al.** (1993). "Evidence for an [Fe]-type hydrogenase in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*." FEBS Lett 317(1-2): 101-104.

- Peck, R. F., S. DasSarma, et al.** (2000). "Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarum* with *ura3* as a counterselectable marker." Mol Microbiol **35**(3): 667-676.
- Peguin S., Goma G., Delorme P., Soucaille P.** (1994). "Metabolic flexibility of *Clostridium acetobutylicum* in response to methyl viologen addition." Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**: 611-616
- Peguin, S. and P. Soucaille** (1995). "Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition." Appl Environ Microbiol **61**(1): 403-405.
- Peguin, S. and P. Soucaille** (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**(3): 342-348.
- Pelicic, V., S. Morelle, et al.** (2000). "Mutagenesis of *Neisseria meningitidis* by *in vitro* transposition of Himar1 *mariner*." J Bacteriol **182**(19): 5391-5398.
- Perego, M.** (1993). Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria : Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, pp. 61 5-624. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Perret, S., H. Maamar, et al.** (2004). "Use of antisense RNA to modify the composition of cellulosomes produced by *Clostridium cellulolyticum*." Mol Microbiol **51**(2): 599-607.
- Pestka, S., B. L. Daugherty, et al.** (1984). "Anti-mRNA: specific inhibition of translation of single mRNA molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7525-7528.
- Peters, J. W.** (1999). "Structure and mechanism of iron-only hydrogenases." Curr Opin Struct Biol **9**(6): 670-676.
- Peters, J. W., W. N. Lanzilotta, et al.** (1998). "X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution." Science **282**(5395): 1853-1858.
- Petersen, D. J., R. W. Welch, et al.** (1991). "Molecular cloning of an alcohol (butanol) dehydrogenase gene cluster from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." J Bacteriol **173**(5): 1831-1834.
- Petitdemange, H., C. Cherrier, et al.** (1977). "[Study of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductase activities in *Clostridium acetobutylicum*]." Can J Microbiol **23**(2): 152-160.
- Phillips-Jones, M. K.** (1993). "Bioluminescence (*lux*) expression in the anaerobe *Clostridium perfringens*." FEMS Microbiol Lett **106**(3): 265-270.

- Phillips-Jones, M. K.** (2000). "Use of a lux reporter system for monitoring rapid changes in alpha-toxin gene expression in *Clostridium perfringens* during growth." FEMS Microbiol Lett **188**(1): 29-33.
- Posewitz, M. C., P. W. King, et al.** (2004). "Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase." J Biol Chem **279**(24): 25711-25720.
- Pottathil, M. and B. A. Lazazzera** (2003). "The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*." Front Biosci **8**: d32-45.
- Priefer, U. B., R. Simon, et al.** (1985). "Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions." J Bacteriol **163**(1): 324-330.
- Pritchett, M. A., J. K. Zhang, et al.** (2004). "Development of a markerless genetic exchange method for *Methanosarcina acetivorans* C2A and its use in construction of new genetic tools for methanogenic archaea." Appl Environ Microbiol **70**(3): 1425-1433.
- Purdy, D., T. A. O'Keefe, et al.** (2002). "Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier." Mol Microbiol **46**(2): 439-452.
- Rao, G. and R. Mutharasan** (1987). "Altered Electron Flow in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum* Induced by Viologen Dyes." Appl Environ Microbiol **53**(6): 1232-1235.
- Reyrat, J. M., V. Pelicic, et al.** (1998). "Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis." Infect Immun **66**(9): 4011-4017.
- Roca, A. I. and M. M. Cox** (1990). "The RecA protein: structure and function." Crit Rev Biochem Mol Biol **25**(6): 415-456.
- Roca, A. I. and M. M. Cox** (1997). "RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **56**: 129-223.
- Rogers, P.** (1986). "Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes". Adv. Appl. Microbiol. 31: 1-60.
- Westheimer F.H. (1963), *Proc. Chem. Soc.*, 253
- Rubin, E. J., B. J. Akerley, et al.** (1999). "In vivo transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1645-1650.
- Saier, M. H., Jr., S. Chauvaux, et al.** (1996). "Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria." Microbiology **142** (Pt 2): 217-230.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory.

- Sambrook, Joseph** (2001). "Molecular Cloning": A Laboratory Manual / Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al.** (1992). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." Biotechnology **24**: 104-108.
- Sara, M. and U. B. Sleytr** (2000). "S-Layer proteins." J Bacteriol **182**(4): 859-868.
- Sassetti, C. M., D. H. Boyd, et al.** (2001). "Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12712-12717.
- Sauer U. and 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 Microbiol. Lett. 125: 115-120
- Schardinger F.** (1904). "Acetongärung". Wiener Klin. Wochenschr. 17: 207-209.
- Schardinger F.** (1905). "*Bacillus macerans*, ein Aceton bildender Rottebacillus". Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II 14: 772-781.
- Schneider, K., R. Cammack, et al.** (1979). "The iron-sulphur centres of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*." Biochim Biophys Acta **578**(2): 445-461.
- Schujman, G. E., R. Grau, et al.** (1998). "De novo fatty acid synthesis is required for establishment of cell type-specific gene transcription during sporulation in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **29**(5): 1215-1224.
- Schut, G. J. and M. W. Adams** (2009). "The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production." J Bacteriol **191**(13): 4451-4457.
- Scotcher, M. C., F. B. Rudolph, et al.** (2005). "Expression of *abrB310* and SinR, and effects of decreased *abrB310* expression on the transition from acidogenesis to solventogenesis, in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl Environ Microbiol **71**(4): 1987-1995.
- Shuman, S.** (1994). "Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase." J Biol Chem **269**(51): 32678-32684.
- Seedorf, H., W. F. Fricke, et al.** (2008). "The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2128-2133.
- Servinsky, M. D., J. T. Kiel, et al.** (2010). "Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*." Microbiology **156**(Pt 11): 3478-3491.

- Singh, K. D., M. H. Schmalisch, et al.** (2008). "Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources." J Bacteriol **190**(21): 7275-7284.
- Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R.,** (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 359–378.
- Spring, K. J., J. S. Mattick, et al.** (1994). "*Escherichia coli* gpt as a positive and negative selectable marker in embryonal stem cells." Biochim Biophys Acta **1218**(2): 158-162.
- Stackebrandt, E., Hippe, H.** (2001): "Taxonomy and systematics". In Clostridia: biotechnology and medical applications, Bahl, H., Dürre, P., 19-45, Wiley-VCH, Weinheim.
- Steffen, C. and H. Matzura** (1989). "Nucleotide sequence analysis and expression studies of a chloramphenicol-acetyltransferase-coding gene from *Clostridium perfringens*." Gene **75**(2): 349-354.
- Stewart, G. S. and P. Williams** (1992). "lux genes and the applications of bacterial bioluminescence." J Gen Microbiol **138**(7): 1289-1300
- Tangney, M., J. K. Brehm, et al.** (1998). "A gene system for glucitol transport and metabolism in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052." Appl Environ Microbiol **64**(5): 1612-1619.
- Tangney, M., C. Rouse, et al.** (1998). "Note: sucrose transport and metabolism in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052." J Appl Microbiol **84**(5): 914-919.
- Tangney, M. and W. J. Mitchell** (2000). "Analysis of a catabolic operon for sucrose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." J Mol Microbiol Biotechnol **2**(1): 71-80.
- Tangney, M., G. T. Winters, et al.** (2001). "Characterization of a maltose transport system in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." J Ind Microbiol Biotechnol **27**(5): 298-306.
- Tangney, M., A. Galinier, et al.** (2003). "Analysis of the elements of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." J Mol Microbiol Biotechnol **6**(1): 6-11.
- Tangney, M. and W. J. Mitchell** (2007). "Characterisation of a glucose phosphotransferase system in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl Microbiol Biotechnol **74**(2): 398-405.
- Terracciano, J. S. and E. R. Kashket** (1986). "Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*." Appl Environ Microbiol **52**(1): 86-91.

- Tomas, C. A., K. V. Alsaker, et al.** (2003). "DNA array-based transcriptional analysis of asporogenous, nonsolventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains SKO1 and M5." J Bacteriol **185**(15): 4539-4547.
- Tomas, C. A., N. E. Welker, et al.** (2003). "Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program." Appl Environ Microbiol **69**(8): 4951-4965.
- Tomas, C. A., J. Beamish, et al.** (2004). "Transcriptional analysis of butanol stress and tolerance in *Clostridium acetobutylicum*." J Bacteriol **186**(7): 2006-2018.
- Tracy, B.P** (2009) "methods and compositions for genetically engineering clostridia species".
- Tummala, S. B., S. G. Junne, et al.** (2003). "Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations." J Bacteriol **185**(12): 3644-3653.
- Tummala, S. B., N. E. Welker, et al.** (2003). "Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*." J Bacteriol **185**(6): 1923-1934.
- Ullmann S., A. Kuhn and P. Dürre** (1996). "DNA topology and gene expression in *Clostridium acetobutylicum*: implications for the regulation of solventogenesis". Biotechnol. Lett. **18**: 1413-1418.
- Van Ginkel, S.W., Oh, S.E., Logan, B.E.** (2005): "Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters". Int. J. Hydrogen Energy **30**: 1535-42.
- Vasconcelos, I., L. Girbal, et al.** (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**(5): 1443-1450.
- Vignais, P. M., B. Billoud, et al.** (2001). "Classification and phylogeny of hydrogenases." FEMS Microbiol Rev **25**(4): 455-501.
- Villafane, R., D. H. Bechhofer, et al.** (1987). "Replication control genes of plasmid pE194." J Bacteriol **169**(10): 4822-4829.
- Vollherbst-Schneck, K., J. A. Sands, et al.** (1984). "Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl Environ Microbiol **47**(1): 193-194.
- Voordouw, G. and S. Brenner** (1985). "Nucleotide sequence of the gene encoding the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough)." Eur J Biochem **148**(3): 515-520.

- Wagner, A. F., M. Frey, et al.** (1992). "The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(3): 996-1000.
- Wagner, E. G. and R. W. Simons** (1994). "Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids." Annu Rev Microbiol **48**: 713-742.
- Wahlstrom, E., M. Vitikainen, et al.** (2003). "The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*." Microbiology **149**(Pt 3): 569-577.
- Walter, K. A., G. N. Bennett, et al.** (1992). "Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes." J Bacteriol **174**(22): 7149-7158.
- Walter, K. A., L. D. Mermelstein, et al.** (1994). "Studies of recombinant *Clostridium acetobutylicum* with increased dosages of butyrate formation genes." Ann N Y Acad Sci **721**: 69-72.
- Wang, Y., X. Li, et al.** (2011). "Single-nucleotide resolution analysis of the transcriptome structure of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 using RNA-Seq." BMC Genomics **12**: 479.
- Warner, J. B. and J. S. Lolkema** (2003). "CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **67**(4): 475-490.
- Waschkau, B., J. Waldeck, et al.** (2008). "Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants." Appl Microbiol Biotechnol **78**(1): 181-188.
- Watson, R., Wright, C.J., McBurney, T., Taylor, A.J., Linforth, R.S.T.** (2002): "Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavor compounds". J. Exp. Bot. **53**: 2121-29.
- Weidner, G. and G. Sawers** (1996). "Molecular characterization of the genes encoding pyruvate formate-lyase and its activating enzyme of *Clostridium pasteurianum*." J Bacteriol **178**(8): 2440-2444.
- Williams, D. R., D. I. Young, et al.** (1990). "Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Clostridium acetobutylicum*." J Gen Microbiol **136**(5): 819-826.
- Winzer, K., K. Lorenz, et al.** (2000). "Differential regulation of two thiolase genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792." J Mol Microbiol Biotechnol **2**(4): 531-541.
- Wong, S. M. and J. J. Mekalanos** (2000). "Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10191-10196.
- Wood, N. P. and K. Jungermann** (1972). "Inactivation of the pyruvate formate lyase of *Clostridium butyricum*." FEBS Lett **27**(1): 49-52.

- Youderian, P., N. Burke, et al.** (2003). "Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element *mariner*." Mol Microbiol **49**(2): 555-570.
- Yu, Y., M. Tangney, et al.** (2007). "Analysis of the mechanism and regulation of lactose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl Environ Microbiol **73**(6): 1842-1850.
- Zhao, Y., C. A. Tomas, et al.** (2005). "Intracellular butyryl phosphate and acetyl phosphate concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and their implications for solvent formation." Appl Environ Microbiol **71**(1): 530-537.
- Zverlov, V. V., O. Berezina, et al.** (2006). "Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery." Appl Microbiol Biotechnol **71**(5): 587-597.

7. Anhang

Länge der Antisense-RNA Konstrukte und Position der Northern-Blot Sonden

5` atgaaaacaa taatcttaaa tggcaatgaa gtgcatacag ataaagatat tactatcctt
tacttttggt attagaatth accgttactt cacgtatgtc tatttctata atgataggaa

gagctagcaa gagaaaataa tgtagatata ccaacactct gctttttaa ggattgtggc
ctcgatcgtt ctcttttatt acatctatag ggttgtgaga cgaaaaatth ctaaacaccg

aattttggaa aatgcccagt ctgtatggta gaggtagaag gcaagggctt tagagctgct
ttaaacctt ttacgcctca gacatccat ctccatcttc cgttcccga atctcgaca

tgtgttgcca aagttgaaga tggaaatggta ataaacacag aatccgatga agtaaaagaa
acacaacggt ttcaacttct accttaccat tatttgtgtc ttaggctact tcattttctt

cgaatcaaaa aaagagtttc aatgcttctt gataagcatg aatttaaagt tggacaatgt
gcttagtttt tttctcaaag ttacgaagaa ctattcgtac ttaaatttac acctgttaca

tctagaagag aaaattgtga attccttaaa cttgtaataa agacaaaagc aaaagcttca
agatcttctc ttttaacact taaggaatth gaacattatt tctgttttcg ttttcgaagt

aaaccatttt taccagaaga taaggatgct ctagttgata atagaagtaa ggctattgta
tttggtaaaa atggcttctt attcctacga gatcaactat tatcttcatt ccgataacat

attgacagat caaaatgtgt actatgcggt agatgcgtag ctgcatgtaa acagcacaca
taactgtcta gttttacaca tgatacgcca tctacgcac gacgtacatt tgcgtgtgt

agcacttgct caattcaatt tattaaaaa gatggacaaa gggctgttgg aactgttgat
tcgtgaacga gtttaagttaa ataatttttt ctacctgttt cccgacaacc ttgacaacta

▲ *ashyDA30*

gatgtttgtc ttgatgactc aacatgctta ttatgcggtc agtgtgtaat cgcttgcct
ctacaaacag aactactgag ttgtacgaat aatacgccag tcacacatta gcgaacagga

gttgctgctt taaaagaaaa atccatata gaaaaagttc aagaagctct taatgacct
caacgacgaa attttcttt tagggtatat ctttttcaag ttcttcgaga attactggga

aaaaaacatg tcattgttgc aatggctcca tcagtaagaa ctgctatggg cgaattattc
tttttgtac agtaacaacg ttaccgaggt agtcattctt gacgataccc gcttaataag

aaaatgggat atggaaaaga tgtaacagga aaactatata ctgcacttag aatgttaggc
ttttacccta taccttttct acattgtcct tttgatata gacgtgaatc ttacaatccg

tttgataaag tatttgatat aaactttggt gcagatatga ctataatgga agaagctact
aaactatttc ataaactata tttgaaacca cgtctatact gatattacct tcttcgatga

gaacttttag gcagagttaa aaataatggc ccattcccta tgtttacatc ttgctgtcct
cttgaaaatc cgtctcaatt tttattaccg ggtaagggat acaaatgtag aacgacagga

gcatgggtaa gattagctca aaattatcat cctgaattat tagataatct ttcatcagca
cgtaccatt ctaatcgagt tttaatagta ggacttaata atctattaga aagtagtctg

aatcaccac acaaatatt tggactgca tcaaaaactt actatccttc aatttcagga
tttagtggtg ttgtttataa accatgacgt agtttttgaa tgataggaag ttaaagctc

fortlaufende Sequenz

```

atagctccag aagatgttta tacagttact atcatgcctt gtaatgataa aaaatatgaa
tatcgaggtc ttctacaaat atgtcaatga tagtacggaa cattactatt tttatactt
      ▲ ashydA60
gcagatattc ctttcatgga aactaacagc ttaagagata ttgatgcatc cttactaca
cgtctataag gaaagtacct ttgattgtcg aattctctat aactacgtag gaattgatgt

agagagcttg caaaaatgat taaagatgca aaaattaaat ttgcagatct tgaagatgg
tctctcgaac gtttttacta atttctacgt ttttaattta aacgtctaga acttctacca

gaagttgatc ctgctatggg tacttacagt ggtgctggag ctatcttttg tgcaaccgg
cttcaactag gacgataccc atgaatgtca ccacgacctc gatagaaacc acgttggcca

ggcgttatgg aagctgcaat aagatcagct aaagactttg ctgaaaataa agaacttgaa
cgcgaatacc ttcgacgtta ttctagtcga tttctgaaac gacttttatt tcttgaactt

aatgttgatt aactgaagt aagaggcttt aaaggcataa aagaagcggg agttgaaatt
ttacaactaa tgtgacttca ttctccgaaa tttccgtatt ttcttcgcct tcaactttaa

gctggaaata aactaaacgt tgctgttata aatggtgctt ctaacttctt cgagtttatg
cgacctttat ttgatttgca acgacaatat ttaccacgaa gattgaagaa gctcaaatac

aaatctggaa aaatgaacga aaaacaatat cactttatag aagtaatggc ttgccctgg
tttagacctt tttacttgct ttttgttata gtgaaatata ttcattaccg aacgggacca

ggatgtataa atggtggagg tcaacctcac gtaaagtctc ttgatagaga aaatggtgat
cctacatatt taccacctcc agttggagtg catttacgag aactatctct tttacaacta

tacagaaaac taagagcatc agtattatac aaccaagata aaaatgttct ttcaaagaga
atgtcttttg attctcgtag tcataatatg ttggttctat ttttacaaga aagtttctct

aagtcacatg ataatccagc tattattaaa atgtatgata gctacttttg aaaaccaggt
ttcagtgtag tattaggtag ataataattt tacatactat cgatgaaacc ttttgggtcca
      ▲ ashydA94
gaaggacttg ctcaaaaatt actacacgta aaatacacia aagataaaaa tgtttcaaaa
cttctgaac gagtgtttaa tgatgtgcat tttatgtgtt ttctattttt acaaagtttt

catgaataa 3`
gtacttatt

```

Abbildung 7.1: Gensequenz der Hydrogenase HydA aus *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Dargestellt ist die chromosomale Sequenz von *hydA* in 5' → 3' Richtung. Der `antisense`-Strang des *hydA* Gens wird in den Vektoren pDK1, pDK2 und pDK3 ausgehend von dem Thiolase Promotor (P_{thl}) gelesen. Die Länge der Antisense-RNA Konstrukte, ausgehend vom Start-Codon ATG, ist mit einem Dreieck markiert. Die Position der Sonden zur Detektion der mRNA und asRNA der Hydrogenase in der Northern-Blot Analysen ist durch unterstrichene Sequenzen gekennzeichnet.

Verwendete Oligonukleotide

Tab. 7.1: Amplifikation der Antisense-RNA Konstrukte und der Vektor-Kontrolle. Unterstrichene Sequenzen kennzeichnen eingefügte Restriktionsschnittstellen. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
HydA_fwd	AT <u>AGGATCCT</u> TAATAATAGCTG GATTATC	Amplifikation <i>hydA</i> Gen (94 %), <i>Bam</i> HI
HydA_rev	AT <u>AGGCGCC</u> ATGAAAACAATAA TCTTAAATGG	Amplifikation <i>hydA</i> Gen (<i>Nar</i> I)
HydA60_fwd	AT <u>AGGATCC</u> GTAAGTGTATAAA CATCTTC	Amplifikation <i>hydA</i> Gen (60 %), <i>Bam</i> HI
HydA30_fwd	AT <u>AGGATCCC</u> AACAGCCCTTTGT CCATCT	Amplifikation <i>hydA</i> Gen (30 %), <i>Bam</i> HI
DK3_fwd	CATTAGTGCATTTAAGCGTCAGA G	Sequenzierungsprimer der Vektoren
DK4_rev	TCATTAGGCACCCCAGGCTTT	Sequenzierungsprimer der Vektoren

Tab. 7.2: Detektion von mRNA und asRNA der Hydrogenase HydA. Hervorgehobene Sequenzen kennzeichnen eingefügte T7-RNA Polymerase Erkennungssequenzen. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
HydA30_as RNA_fwd	AATTGAATTGAGCAAGTGCTTGT G	Sonde gegen asRNA
HydA30_as RNA_rev	TAATACGACTCACTATAGGGA G AATGAAAACAATAATCTTAAA TG	Sonde gegen asRNA
HydA30_ mRNA_fwd	ATGAAAACAATAATCTTAAATG	Sonde gegen mRNA
HydA30_ mRNA_rev	TAATACGACTCACTATAGGGA G AAATTGAATTGAGCAAGTGCT TGTG	Sonde gegen mRNA

Tab. 7.3: Konstruktion der Deletionsvektoren. Unterstrichene Sequenzen kennzeichnen eingefügte Restriktionsschnittstellen. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
<i>upp_up_rev</i>	ATA <u>AAGCTT</u> ACTTGCCTCGGT AATG	Amplifikation up, Homologieregion <i>upp</i> , Konstruktion von pMADK upp^- (<i>HindIII</i>)
<i>upp_upF_fwd</i>	TACAATGGAGGAATGAAATA ATTGCATAAATAAAAAGGGC	Fusionsprimer, Konstruktion von pMADK upp^-
<i>upp_downF_fwd</i>	GCCCTTTTTATTTATGCAATTA TTTCATTCCTCCATTGTA	Fusionsprimer, Konstruktion von pMADK upp^-
<i>upp_down_fwd</i>	ATA <u>GGATCC</u> AGCTTTTTCAGC AGGTG	Amplifikation down, Homologieregion <i>upp</i> , Konstruktion von pMADK upp^- (<i>BamHI</i>)
<i>upp_Abc_fwd</i>	ATA <u>GGATCC</u> AGCAATATGGA GGTTGTAAA	Amplifikation CA_C2878 für pMADK upp^- II, pDK15, pDK16 (<i>BamHI</i>)
<i>upp_Rib_rev</i>	ATA <u>AAGCTT</u> GGTAGTTAGGGA GAACTTAGGCA	Amplifikation CA_C2880 für pMADK upp^- II, pDK15, pDK16 (<i>HindIII</i>)
<i>recA_fwd</i>	ATA <u>GGTACCT</u> GATTTATTTTG CATAAAATGGATATAA	Amplifikation <i>recA</i> mit nativem Promotor (<i>KpnI</i>)
<i>recA_rev</i>	ATA <u>GAAATTC</u> TTATTTTGTATT ATTTTCAGTTCCTTTTCA	Amplifikation <i>recA</i> mit nativem Promotor (<i>EcoRI</i>)
<i>marR_fwd</i>	ATA <u>GATATC</u> GATAATTTAGAA ATGTTGGCGCTG	Amplifikation <i>marR</i> , Homologieregion <i>pdv</i> , Konstruktion von pDK13 (<i>EcoRV</i>)

Anhang

<i>marRF_rev</i>	TTTAAAATGCTATATTTTGAA AATTGTCACCTCCACCTTAAT T	Fusionsprimer, Konstruktion von pDK13
<i>hypF_fwd</i>	AATTAAGGTGGAGGTGACAA TTTTCAAATATAGCATTTTA AA	Fusionsprimer, Konstruktion von pDK13
<i>hyp_rev</i>	ATAGGATCCTGGGACTTACCT TG TTCCTT	Amplifikation hyp. Gen, Homologieregion <i>pd</i> c, Konstruktion von pDK13 (<i>Bam</i> HI)
<i>cbs_fwd</i>	ATAGGATCCTGTGTATAAATA CAGGAGAATGCTG	Amplifikation <i>cbs</i> , Homologieregion <i>pfl</i> B, Konstruktion von pDK14 (<i>Bam</i> HI)
<i>cbsF_rev</i>	AATGAATTTTTCCCAAATTAA CACCTACAAAACTCTCCTTC ATTT	Fusionsprimer, Konstruktion von pDK14
<i>pflAF_fwd</i>	AAATGAAGGAGAGTTTTTGTA GGTGTTAATTTGGGAAAATT CATT	Fusionsprimer, Konstruktion von pDK14
<i>pflA_rev</i>	ATAGGATCCTGTAATTGCTGC TCAGGCTCAA	Amplifikation <i>pfl</i> A, Homologieregion <i>pfl</i> B, Konstruktion von pDK14 (<i>Bam</i> HI)

Tab. 7.4: Überprüfung auf Rekombination in *C. acetobutylicum* ATCC 824. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
<i>upp_down_fwd</i>	CCATGGAGAAAGTGGCTCTTTG C	1. Rekombination über down-Fragment
<i>upp_down_rev</i>	GCCAGGAATAAGAGCAGCTGTA TG	1. Rekombination über down-Fragment
<i>upp_up_fwd</i>	TCCAGGTGGAACAGTTGCCCTTA C	1. Rekombination über up-Fragment
<i>upp_up_rev</i>	CAGCAGGTGCATCTGCTATTCAT GG	1. Rekombination über up-Fragment
<i>checkΔupp_fwd</i>	GGAACAGTTGCCCTTACATCTGT ATTAAC	Untersuchung auf 2. Rekombination
<i>checkΔupp_rev</i>	GTGCCAGGAATAAGAGCAGCTG TATG	Untersuchung auf 2. Rekombination

Tab. 7.5: Reportersystem und Transposonmutagenese. Unterstrichene Sequenzen kennzeichnen eingefügte Restriktionsschnittstellen. Hervorgehobene Sequenzen entsprechen revers-komplementäre Sequenzen. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
<i>Padc_fwd</i>	ATAC <u>CTGCAGGATGC</u> AAGATTTT TAGGAAGT	Amplifikation des <i>adc</i> - Promotors (<i>Sbf</i> I), Konstruktion von pDK4 und pDK5
<i>PadcF_Pp1-Cl_</i> <i>rev</i>	AGAAGTTTTGCATTTATCATAAA AGTCACCTTCCTAAATT	Fusionsprimer, Konstruktion von pDK4
<i>PadcF_Pp1-Cl_</i> <i>fwd</i>	AATTTAGGAAGGTGACTTTTATG ATAAATGCAAACCTTCT	Fusionsprimer, Konstruktion von pDK4
<i>Evo Pp1-Cl_rev</i>	ATAG <u>ATATCT</u> TAAATGTTTTGCTT GTCCTT	Amplifikation von <i>evoglow Pp1-Cl</i> (<i>EcoRV</i>), Konstruktion von pDK4

Anhang

<i>PadcF_Bs2-Cl_</i> rev	AAACTTTGAAA <u>ACTTGCCATAA</u> AAGTCACCTTCCTAAATT	Fusionsprimer, Konstruktion von pDK5
<i>PadcF_Bs2-Cl_</i> fwd	AATTTAGGAAGGTGACTTTTATG GCAAGTTTTCAAAGTTT	Fusionsprimer, Konstruktion von pDK5
Evo Bs2-Cl_rev	ATAGATATC <u>TTATTCAAGAAGCT</u> TTTCAT	Amplifikation von <i>evoglow Bs2-Cl</i> (<i>EcoRV</i>), Konstruktion von pDK5
<i>Padc_2_fwd</i>	ATAGGATCCATGCAGAATTTTTA GGAAGT	Amplifikation des <i>adc</i> - Promotors (<i>Bam</i> HI), Konstruktion von pDK6
Evo Pp1Cl_2_ rev	ATAA <u>AAGCTTTTAATGTTTTGCTT</u> GTCCTT	Amplifikation von <i>evoglow Pp1-Cl</i> (<i>Hind</i> III), Konstruktion von pDK6
Himar1_fwd	ATAGAATTCATTAGTCATCTGGA TGATGA	Amplifikation <i>Himar1</i> (<i>Eco</i> RI), Konstruktion von pDK9
Himar1F_rev	CAATTCATCCAGTAAAATAT <u>CCTC</u> <u>GAGCCGGTGATATTCTCATT</u> TTTA	Fusionsprimer (<i>Xho</i> I), Konstruktion von pDK9
Himar1F_fwd	TAAAATGAGAATATCACC <u>GGCT</u> <u>CGAGATATTTTACTGGATGAATT</u> G	Fusionsprimer (<i>Xho</i> I), Konstruktion von pDK9
Himar1_rev	ATAC <u>CATGGAGCTTGCATGCCTG</u> CAGTAAC	Amplifikation <i>TnYLB-1</i> (<i>Nco</i> I), Konstruktion von pDK9
pMarA_fwd	CCTCTTTTCTACAGTATTTAAAG ATACCCCAAG	Hybridisierungsprimer für <i>tetM</i> und <i>catP</i>
pMarA_rev	GATGTCTAAAAAGCTTTAACTAC AAGCTTTTTAGACAT	Hybridisierungsprimer für <i>tetM</i> und <i>catP</i>
<i>catP_fwd</i>	TTAACTATTTATCAATTCCTGCA ATTCGTTTA	Hybridisierungsprimer <i>catP</i>
<i>catP_rev</i>	TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAA AAGAG	Hybridisierungsprimer <i>catP</i>

pMarAST rev	TTATTATTTTCCTTCCTCTTTTCT ACAGTATTTAAAGATACCCCAA G	Hybridisierungsprimer für pMarA und <i>catP</i>
pMarAST fwd	TACCTAGATTTAGATGTCTAAA AAGCTTTAACTACAAGCTTTTTA GACAT	Hybridisierungsprimer für pMarA und <i>catP</i>
<i>catPST</i> fwd	TAAATCTAGGTATTA ACTATTT ATCAATTCCTGCAATTCGTTTA	Hybridisierungsprimer für pMarA und <i>catP</i>
<i>catPST</i> fwd	AAGGAAATAATA TGAAGCCA GTTACCTTCGGAAAAAGAG	Hybridisierungsprimer für pMarA und <i>catP</i>
<i>tetM</i> _fwd	CTAAGTTATTTTATTGAACATAT ATCGTACTTTATCTATCCG	Hybridisierungsprimer <i>tetM</i>
<i>tetM</i> _rev	GCTATTTTGTAATCACGTACTCT CTTTGATAAA	Hybridisierungsprimer <i>tetM</i>
<i>tetMST</i> _fwd	TAAATCTAGGTACTA AGTTATT TTATTGAACATATATCGTACTTT ATCTATCCG	Hybridisierungsprimer für pMarA und <i>tetM</i>
<i>tetMST</i> _rev	AAGGAAATAATA AGCTATTTTG TAATCACGTACTCTTTGATAA A	Hybridisierungsprimer für pMarA und <i>tetM</i>

Verwendete Enzyme

Sofern nichts anders erwähnt, wurden Enzyme der Firmen Fermentas (St. Leon-Rot), Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich (München), Qiagen (Hilden) und Finnzymes (Espoo, Finnland) verwendet.

Verwendete Chemikalien und Geräte

Sofern nichts anders erwähnt, wurden sonstige verwendete Chemikalien von den Firmen Merck, Fluka, Oxoid, Serva, Sigma und Roth in p.A. Qualität bezogen.

Autoklav	Zirbus, Bad Grund, Deutschland
Biofuge fresco (Sorvall # 3328)	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Biofuge primo R (Sorvall # 7588)	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
French Pressure Cell	American Instrument Company, Silver Spring, U.S.A.
Primus HT	MWG AG Biotech
Magnet-Heizrührer	JAK Werk, Staufen
Mikroskop Carl Zeiss	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories California USA
Vortex Genie 2 TM	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Spektrophotometer VARIAN CARRY 100Scan	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Waage Sartorius BI 3100	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Typ 2462	
Typ 2254	
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach, Deutschland

Expressionsdaten der durchgeführten Transkriptionsanalysen

Tab. 7.6: Expressionsverhältnisse von Genen verschiedener Transportsysteme in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei logarithmischem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C0231		DeoR-ähnlicher Transkriptions- regulator	3,86	-0,18
CA_C0232	<i>fruB</i>	1-Phosphofrukto- kinase	2,10	0,03
CA_C0233		PTS EIIA-Komponente	1,41	-0,26
CA_C0234		PTS EIIBC-Komponente	1,13	0,52
CA_C0570		PTS EII-Komponente	1,52	-1,18
CA_C0662		Zucker ABC- Transporter, peri- plasmatisches Zucker-bindendes Protein	3,14	1,22
CA_C0663		Hypothetisches Protein	n.b.	1,66
CA_C0664		Zucker-bindendes periplasmatisches Protein	n.b.	0,49

Anhang

CA_C0665		ABC-type Zucker- Transportsystem, Permease- Komponente	n.b.	0,93
CA_C0666		Zucker-Permease	2,01	0,28
CA_C0667		Zucker-bindendes periplasmatisches Protein	1,79	1,56
CA_C1705		Periplasmatisches Phosphat-bindendes Protein	n.b.	2,46
CA_C1706		Phosphat-Permease	n.b.	2,98
CA_C1707		Permease- Komponente	n.b.	2,50
CA_C1708		ATPase- Komponente des ABC-type Phosphat- Transportsystem	n.b.	1,91
CA_C1709	<i>phoU</i>	Phosphat <i>uptake</i> Regulator	n.b.	1,56
CA_C2963	<i>lacG</i>	6-Phospho- β -D- Galaktosidase	0,75	-0,93
CA_C2964	<i>lacE</i>	PTS EIIBC ^{lac} - Komponente	2,16	-0,73
CA_C2965	<i>lacF</i>	PTS EIIA ^{lac} - Komponente	0,98	-0,92
CA_C2966	<i>lacR</i>	DeoR-ähnlicher Transkriptions- regulator	1,96	-0,90
CA_C3422		Zucker:Protonen- symporter (Xylulose)	4,57	-0,48
CA_C3550	<i>natB</i>	Natrium ABC- Transporter	-0,39	1,86

Anhang

CA_C3551	<i>natA</i>	Natrium ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	0,23	1,78
CA_C3680	<i>kdpC/atkC</i>	K ⁺ -transportierende ATPase	-2,28	1,12
CA_C3681	<i>kdpB/atkB</i>	K ⁺ -transportierende ATPase, Untereinheit B	-2,62	1,07
CA_C3682	<i>kdpA/atkA</i>	K ⁺ -transportierende ATPase, Untereinheit A	n.b.	1,54

Tab. 7.7: Expressionsverhältnisse von Genen des *agr* Locus und der frühen Sporulation in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei logarithmischem Wachstum.

Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_P0177		SpoOJ Regulator	1,90	-0,33
CA_C0078	<i>agrB</i>	Genregulator-Protein B	5,19	-0,91
CA_C0079	<i>agrD</i>	<i>Autoinducer</i> Peptid	6,20	-0,34
CA_C0080	<i>agrC</i>	Histidin-Sensor Kinase	1,01	-0,37
CA_C0081	<i>agrA</i>	<i>Response</i> -Regulator-Protein A	-0,08	-0,62
CA_C0686		Sporencortex lytisches Enzym, Peptidoglykan-bindende Domäne	n.b.	1,04

Anhang

CA_C1337	<i>cotJ</i>	Sporenhüllen- Protein COTJB	0,64	1,67
CA_C1696	<i>sigG</i>	Sporulations-Sigma- Faktor SigG	2,71	0,75
CA_C2306	<i>sigF</i>	Sporulations-Sigma- Faktor SigF	2,76	-0,07
CA_C2365	<i>sspA</i>	Kleines Säure- lösliches Sporen- Protein	n.b.	3,40
CA_C3214		SpoVT Sporulations-Protein	n.b.	2,54
CA_C3317	<i>cotF</i>	Sporenhüllen- Protein F (CotF)	n.b.	2,32

Tab. 7.8: Expressionsverhältnisse von Genen der Eisen-Aufnahme bzw. des Transports in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei logarithmischem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C1029		FeoA-ähnliches Protein	1,74	0,24
CA_C1030		FeoA-ähnliches Protein	2,23	0,07
CA_C1031	<i>feoB</i>	FeoB-ähnliches GTPase	4,45	0,51
CA_C1989		ABC-ähnliches Fe(III) Transport- system, ATPase	1,25	0,13

Anhang

CA_C1990	ABC-ähnliches Fe(III) Transport- system, Permease	1,46	-0,09
CA_P0057	Putatives Glycoprotein oder <i>S-layer</i>	4,74	-0,53
CA_P0058	Rare Lipoprotein A (RLPA)	5,99	0,59

Tab. 7.9: Expressionsverhältnisse von Genen verschiedener Transportsysteme in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_P0066	<i>ptna</i>	Mannose- spezifisches PTS, EIIAB- Komponente	0,99	0,99
CA_P0067	<i>manY/</i> <i>levF</i>	Mannose/Fruktose- spez. PTS, EIIC-Komponente	1,33	1,13
CA_P0068	<i>ptnd</i>	Mannose- spezifisches PTS, EIID-Komponente	1,03	1,15
CA_C0231		DeoR-ähnlicher Transkriptions- regulator	1,26	0,36
CA_C0232	<i>fruB</i>	1-Phosphofrukto- kinase	1,82	0,26

Anhang

CA_C0233		PTS EIIA-Komponente	0,79	-0,30
CA_C0234		PTS EIIBC- Komponente	1,87	1,32
CA_C2963	<i>lacG</i>	6-Phospho- β -D- Galaktosidase	1,13	1,81
CA_C2964	<i>lacE</i>	PTS EIIBC ^{lac} - Komponente	0,64	1,53
CA_C2965	<i>lacF</i>	PTS EIIA ^{lac} - Komponente	0,45	0,91
CA_C2966	<i>lacR</i>	Laktose-PTS Repressor	0,41	1,41
CA_C3288		Eisen ABC- Transporter ATPase Untereinheit	1,89	-0,90
CA_C3289		Eisen ABC- Transporter Membran- Komponente	2,05	-0,71
CA_C3290		Eisen ABC- Transporter Membran- Komponente	1,73	-0,49
CA_C3422		Zucker:Protonen- symporter (Xylulose)	0,27	1,85
CA_C3550	<i>natB</i>	Natrium ABC- Transporter	2,97	1,11
CA_C3551	<i>natA</i>	Natrium ABC- Transporter, ATP- bindendes Protein	2,54	1,14

Tab. 7.10: Expressionsverhältnisse von Genen der Chorismat-Biosynthese in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C0892		3-Deoxy-7-Phospho-heptulonat-Synthase	1,11	0,51
CA_C0893		Prephenat-Dehydrogease	1,23	0,40
CA_C0894	<i>aroB</i>	3-Dehydroquinat-Synthetase	1,26	0,08
CA_C0895	<i>aroA</i>	3-Phosphoshikimat-1-carboxyvinyl-Transferase	1,51	0,09
CA_C0896	<i>aroC</i>	Chorismat-Synthase	1,50	0,25
CA_C0897	<i>aro</i>	Fusion Chorismat-Mutase und Shikimat-5-Dehydrogenase	0,84	0,32
CA_C0898	<i>aroK</i>	Shikimat-Kinase	n.b.	-0,17
CA_C0899		3-Dehydroquinat-Dehydratase	n.b.	0,91

Tab. 7.11: Expressionsverhältnisse von Genen der Biotin-Synthese in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C0210	<i>bioB</i>	Biotin-Synthase	n.b.	1,52
CA_C1360	<i>bioY</i>	Uncharakterisiertes Protein der BioY-Familie	n.b.	4,26
CA_C1361	<i>bioD</i>	Dithiobiotin-Synthetase	n.b.	4,23
CA_C1362	<i>bioA</i>	Adenosylmethionin-8-amino-7-Oxononanoat Aminotransferase	n.b.	4,72

Tab. 7.12: Expressionsverhältnisse von Genen Fettsäure-Biosynthese und der Sporulation in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum.

Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C1696	<i>sigG</i>	Sporulation Sigma-Faktor (SigG)	1,40	0,99
CA_C1817	<i>spoVS</i>	Sporulations-Protein, SpoVS	0,41	1,96
CA_C2071		Spo0A Protein	1,20	0,85
CA_C2126	<i>spoVE</i>	Sporulations-Protein E, FtsW/MrdB/SpoVE Familie	0,63	1,71
CA_C2130	<i>spoVD</i>	Sporulations-Protein D, FtsI/pbp Familie	0,44	2,31
CA_C2306	<i>sigF</i>	Sporulations-Sigma-Faktor SigF	0,46	1,13
CA_C2307		Anti-Sigma F Faktor	-0,15	0,99
CA_C2308	<i>spoIIAA</i>	Anti-anti-Sigma-Faktor (Antagonist von SpoIIAB)	0,12	1,91
CA_C3223	<i>spoVG</i>	Sporulations-Protein G	0,91	1,21
CA_C3568	<i>accA</i>	Acetyl-CoA Carboxylase alpha Untereinheit	0,98	0,14
CA_C3569	<i>accD</i>	Acetyl-CoA Carboxylase beta Untereinheit	1,10	0,07

Anhang

CA_C3570	<i>accC</i>	Acetyl-CoA Carboxylase	0,86	0,16
CA_C3571	<i>fabZ</i>	(3R)- Hydroxymyristoyl ACP Dehydratase	0,65	0,52
CA_C3572	<i>accB</i>	Biotin Carboxyl carrier Protein der Acetyl-CoA Carboxylase	1,26	0,27
CA_C3573	<i>fabF</i>	3-Oxoacyl-(Acyl carrier Protein) Synthase	1,11	0,37
CA_C3574	<i>fabG</i>	3-Ketoacyl-(Acyl- carrier-Protein) Reductase	1,38	0,37
CA_C3575	<i>fabD</i>	Acyl-carrier-Protein S-Malonyl- Transferase	0,60	-0,38
CA_C3576		Dioxygenase (2-Nitropropan Dioxygenase)	1,17	n.b.
CA_C3577	<i>acp</i>	Acyl Carrier Protein, ACP	1,02	0,67
CA_C3578	<i>fabH</i>	3-Oxoacyl-(Acyl carrier Protein) Synthase	1,60	-0,02
CA_C3579		Transkriptions- Regulator, MarR / EmrR Familie	2,04	0,10

Tab. 7.13: Expressionsverhältnisse von Genen der Zellstabilität, der Zellteilung und des ‚Quorum sensing‘ in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_P0057		Putatives Glycoprotein oder <i>S-layer</i>	1,12	1,03
CA_P0058		Rare Lipoprotein A (RLPA)	0,24	2,38
CA_C0078	<i>agrB</i>	Genregulator- Protein B	-0,42	1,13
CA_C0079	<i>agrD</i>	<i>Autoinducer</i> Peptid	1,29	0,23
CA_C0080	<i>agrC</i>	Histidin-Sensor Kinase	n.b.	0,53
CA_C0081	<i>agrA</i>	<i>Response</i> -Regulator- Protein A	n.b.	1,02
CA_C1692	<i>ftsA</i>	Zellteilungs-Protein, FtsA	0,56	1,68
CA_C1693	<i>ftsZ</i>	Zellteilungs-Protein, FtsZ	-0,32	0,37
CA_C1871	<i>ftsK</i>	DNA Segregation ATPase, YDCQ B. <i>subtilis</i> Ortholog	n.b.	1,37

Tab. 7.14: Expressionsverhältnisse von Genen verschiedener Stressproteine in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3 bei stationärem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stämmen *C. acetobutylicum* pDK2 und *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis	
			pDK2/pSOSzero	pDK3/pSOSzero
CA_C0456	<i>lonA</i>	ATP-abhängige Protease (lonA)	4,80	0,87
CA_C0457		Transcriptions- Regulator, AcrR Familie	4,37	-0,92
CA_C0471		GrpE Protein HSP- 70 Co-Faktor	1,10	0,19
CA_C0472	<i>dnaK</i>	DnaK Protein (Hitzeschock-Protein), HSP70/DnaK Familie	1,22	0,33
CA_C0473	<i>dnaK</i>	DnaK Protein (Hitzeschock- Protein), C-terminale Region hat VWA type A Domäne	1,16	0,56
CA_C1280	<i>hrcA</i>	Hitze-induzierbarer Transkriptions- Repressor	1,29	-1,20
CA_C1282	<i>dnaK</i>	Molekulares Chaperon DnaK	1,62	-1,17
CA_C1283	<i>dnaJ</i>	Molekulares Chaperon DnaJ (HSP40 Familie)	1,73	-0,05

Anhang

CA_C2637	<i>lonA</i>	ATP-abhängige Lon Protease	0,73	0,56
CA_C2639	<i>clpX</i>	ATP-abhängige Protease ATP- bindende Untereinheit	1,17	0,46
CA_C2703	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	1,67	-0,38
CA_C2704	<i>groES</i>	Co-Chaperonin GroES, HSP10 Familie	1,19	0,35
CA_C3189	<i>clpC</i>	ATPase mit Chaperone Aktivität clpC, zwei ATP- bindende Domänen	2,47	-1,10
CA_C3190		putative ATP Guanido-Phospho- Transferase	1,81	-1,35
CA_C3191		Uncharakterisiertes konserviertes Protein, bestehend aus ClpE-like Zn- Domäne, YACH <i>B. subtilis</i> Ortholog	1,94	-0,86
CA_C3192		Transkriptionas- Regulator CTSR	1,78	-1,92
CA_C3714	<i>hsp18</i>	Molekulares Chaperon (kleines Hitzeschock- Protein), HSP18	3,39	-0,58

Tab. 7.15: Expressionsverhältnisse von Genen der Riboflavin-Synthese in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK2 bei logarithmischem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stamm *C. acetobutylicum* pDK2. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis pDK2/pSOSzero
CA_C0590	<i>ribD</i>	Riboflavin Biosynthese-Protein RIBD	1,34
CA_C0591	<i>ribB</i>	Riboflavin Synthase Untereinheit alpha	2,12
CA_C0592	<i>ribA</i>	Riboflavin Biosynthese-Protein RIBA	1,54
CA_C0593	<i>ribH</i>	Riboflavin Synthase Untereinheit beta	-0,52

Tab. 7.16: Expressionsverhältnisse von Genen der Sulfat-Reduktion und der Cystein-Biosynthese in dem Stamm *C. acetobutylicum* pDK3 bei logarithmischem Wachstum. Werte größer 1 entsprechen einer verstärkten Expression in den Stamm *C. acetobutylicum* pDK3. Werte kleiner -1 hingegen deuten auf eine verstärkte Expression in der Vektor-Kontrolle *C. acetobutylicum* pSOSzero hin. Hierbei handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen. n.b. (nicht bestimmt) kennzeichnet Signal-Intensitäten von Genen, die zumeist unterhalb der des Hintergrunds lagen und somit außerhalb der gewählten Kriterien.

ID	Gen	Annotation	log Expressionsverhältnis pDK3/pSOSzero
CA_C0102		O-Acetylhomoserin Sulfhydrylase	-2,76
CA_C0103	<i>cysC</i>	Adenylylsulfat-Kinase	-2,63
CA_C0104		Adenylylsulfat-Reductase	-2,87
CA_C0106		ABC-type Sulfat-Transporter, periplasmatisches Binde- protein	-2,90
CA_C0107		ABC-type Sulfat-Transporter, ATPase Komponente	-2,92
CA_C0108		ABC-type Sulfat- Transporter, Permease Protein	-2,14
CA_C0109	<i>cysD</i>	Sulfat-Adenylyltransferase 2. Untereinheit	-3,02
CA_C0110	<i>cysN</i>	GTPase, Sulfat-Adenylattransferase 1. Untereinheit	-2,72
CA_C0930	<i>metB</i>	Cystathionin Gamma- Synthase	-1,70

Danksagung

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. W. Liebl für die Ermöglichung dieser Dissertation an seinem Lehrstuhl und die Übernahme des Referats. Besonders möchte ich mich bei Dr. Armin Ehrenreich für die Überlassung des überaus interessanten Themas, für seine Diskussionsbereitschaft und sein Einfallsreichtum bedanken.

Herrn Prof. Dr. C. Schwechheimer und Herrn Prof. Dr. S. Scherer seien für die freundliche Übernahme des Koreferats gedankt.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Wolfgang Schwarz danke ich für die Zusammenarbeit bei den GC-Analysen.

Ein besonderer Dank richtet sich an Anja und Marco. Ich danke Euch für die auflockernde Laboratmosphäre, Eure Verlässlichkeit und Unterstützung. Marco gebührt darüber hinaus ein großer Dank für das Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit.

Ein weiteres Dankeschön gilt den früheren und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die Zusammenarbeit. Justyna und Michael danke ich für Ihre lustige und offene Art sowie für die Einführung in alternative Klonierungsstrategien. Ein Dank gilt auch Agnes Luzak, Christopher Huptas und Arne Fabritius für die Mitarbeit am *Clostridium* Projekt.

An Konny und Beate geht ein besonderer Gruß für die Organisation des Laboralltags, für die schönen Mittagspausen und die herzlichen Gespräche. Josef sei für die schnelle Reparatur von Geräten und die kreative Umsetzung von Ideen gedankt.

Ein herzliches Dankeschön richtet sich an meine Eltern für die finanzielle und moralische Unterstützung, die diese Arbeit erst ermöglichten. Ich danke Euch vielmals!!

Mein größter Dank gebührt meiner Freundin Melanie. Ich danke Dir für deine Unterstützung, deine aufmunternden Worte und deine Zuneigung. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft!

Lebenslauf

Zu meiner Person:

Name: Désirée Krauß

Geburtsdatum: 02.05.1984

Geburtsort: Eisenach

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Naturwissenschaftliche Ausbildung

03/2008 - heute **Weiterführung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München**
Lehrstuhl Prof. W. Liebl, Arbeitsgruppe Dr. Armin Ehrenreich

11/2007 - 03/2008 **Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen**
Lehrstuhl Prof. W. Liebl, Arbeitsgruppe Dr. Armin Ehrenreich

02/2007 – 09/2007 **Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen**
Lehrstuhl Prof. J. Stülke
Thema: PTS-abhängige Regulation in *Ralstonia eutropha* H16
Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Zoologie, Organische Chemie
Hochschulgrad Diplom-Biologe, Gesamtnote: sehr gut

10/2004 **Diplomvorprüfung im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen**
Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Zoologie, Anorganische Chemie und Physik

10/2002 **Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen**
Biologische Fakultät

Schulbildung

08/1994 – 06/2002 Besuch des Ernst-Abbe-Gymnasiums in Eisenach
Gesamtnote: 1,7

08/1990 – 06/1994 Besuch der Hainich-Grundschule in Nazza