

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Funktionelle Genomanalyse von *Clostridium ljungdahlii*

Claudia Maria Held

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. H.-W. Mewes

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

Die Dissertation wurde am 25.01.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21.04.2013 angenommen.



*meiner Familie*







Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1. Gase, Chemikalien und Geräte.....	13
2.2. Bakterienstämme.....	15
2.3. Verwendete Plasmide.....	16
2.4. Zellanzucht.....	17
2.4.1. Nährmedien .....	17
2.4.1.1. <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i> .....	18
2.4.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2.4.1.3. <i>Clostridium ljungdahlii</i> .....	18
2.4.1.4. Agarshakes/Hohe Schicht .....	22
2.4.2. Medienzusätze .....	23
2.4.3. Anzuchtbedingungen .....	24
2.4.4. Stammhaltung.....	24
2.4.5. Reinheitskontrolle.....	24
2.4.6. Bestimmung der optischen Dichte.....	25
2.5. Techniken für das Arbeiten mit DNA.....	25
2.5.1. Geräte und Lösungen.....	25
2.5.2. Isolierung chromosomaler DNA .....	25
2.5.3. Phenol-Chloroform-Extraktion.....	26
2.5.4. DNA-Fällung mit Isopropanol.....	26
2.5.5. Isolierung von Plasmid DNA .....	26
2.5.6. Aufreinigung von PCR-Produkten .....	27
2.5.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	27
2.5.8. Agarose-Gelelektrophorese .....	27
2.5.9. Eckhardt-Lyse.....	29
2.6. Techniken für das Arbeiten mit RNA.....	30
2.6.1. Geräte und Lösungen.....	30
2.6.2. Zellaufschluss von <i>C. ljungdahlii</i> -Zellen mit der Zelmühle .....	30

2.6.3.	Isolierung von RNA.....	31
2.6.4.	DNase Verdau und Qualitätskontrolle der RNA .....	31
2.6.5.	Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung der RNA .....	31
2.7.	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren.....	33
2.7.1.	Restriktion .....	33
2.7.2.	Dephosphorylierung .....	33
2.7.3.	Generierung von <i>blunt ends</i> .....	34
2.7.4.	Ligation.....	34
2.7.5.	Klonierung durch Hybridisierung.....	35
2.8.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
2.8.1.	„Standard“ PCR.....	37
2.8.2.	Reverse Transkription PCR.....	38
2.8.3.	Quantitative <i>Real-time</i> PCR .....	39
2.9.	Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten mittels 5'RLM-RACE .....	42
2.10.	DNA-Transfer in Bakterien .....	43
2.10.1.	Transformation von <i>E. coli</i> .....	43
2.10.1.1.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	43
2.10.1.2.	Blau-Weiß Screening .....	44
2.10.2.	Transformation von <i>C. ljungdahlii</i> .....	45
2.10.2.1.	Transformation durch Elektroporation.....	45
2.10.2.2.	Konjugation.....	46
2.11.	Analyse von Kulturüberständen.....	47
2.11.1.	Ionenchromatographie .....	47
2.11.1.1.	Quantitative Bestimmung von Zuckern .....	48
2.11.1.2.	Quantitative Bestimmung von Anionen.....	51
2.11.1.3.	Quantitative Bestimmung von Kationen .....	52
2.11.2.	Quantitative Bestimmung von Ethanol.....	53
2.11.3.	Gas-Chromatographie.....	53
2.12.	Annotation und Sequenzanalyse .....	54
2.12.1.	ORF-Vorhersage.....	54
2.12.2.	Genomweite Annotation mit ERGO.....	55
2.13.	Hybridisierung und Auswertung von Microarrays .....	55
2.13.1.	Markierung von RNA mit Cy3/Cy5 Fluoreszenzfarbstoff.....	56
2.13.2.	Hybridisierung der <i>probes</i> mit markierter <i>target</i> -cDNA.....	58



2.13.3.	Quantifizierung der Arraydaten mit ‚GenePix Pro 4.0‘ .....	61
2.13.4.	Analyse der Transkriptionsdaten .....	64
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
3.1.	Das Genom von <i>C. ljungdahlii</i> .....	65
3.1.1.	Allgemeine Eigenschaften .....	65
3.1.2.	Autotrophes Wachstum .....	68
3.1.2.1.	Wood-Ljungdahl-Weg .....	69
3.1.2.2.	Hydrogenasen .....	71
3.1.2.3.	Anaerobe CO-Dehydrogenase .....	71
3.1.3.	Heterotrophes Wachstum .....	71
3.1.3.1.	Glykolyse .....	72
3.1.3.2.	Pentose-Phosphat-Weg .....	75
3.1.4.	Bioenergetik .....	78
3.1.4.1.	Rnf-Komplex .....	79
3.1.4.2.	Etf-Gene .....	79
3.1.4.3.	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -Typ-ATPase .....	80
3.1.5.	Stickstoffmetabolismus .....	80
3.1.6.	Vitaminbiosynthese .....	81
3.1.7.	Ethanolproduktion und –verbrauch .....	82
3.1.8.	Glycin- und Betainabbau .....	83
3.1.9.	Selenocysteinbiosynthese .....	85
3.1.10.	O-Demethylierungssysteme und Cobalamin-abhängige Methyltransferasen ..	86
3.2.	Wachstumsversuche .....	87
3.2.1.	Wachstumsverhalten von <i>C. ljungdahlii</i> bei steigenden Ethanolkonzentrationen .....	89
3.2.2.	Wachstum von <i>C. ljungdahlii</i> in Natrium-freien Medium .....	90
3.2.3.	Referenzbedingung bei Transkriptionsanalysen .....	91
3.2.4.	Autotrophes Wachstum .....	92
3.2.4.1.	Transkriptionsanalysen des autotrophen Wachstums auf Synthesegas im Vergleich zum heterotrophen Wachstum auf Fruktose .....	93
3.2.4.2.	Transkriptionsanalysen des autotrophen Wachstums auf H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> im Vergleich zum heterotrophen Wachstum auf Fruktose .....	104
3.2.5.	Wachstum auf Betain und Ethanol: eine Stickland-analoge Reaktion .....	112
3.2.5.1.	Bestimmung der Fermentationsprodukte der Stickland-ähnlichen Reaktion	113

3.2.5.2.	Transkriptionsanalysen des Wachstums auf Betain und Ethanol im Vergleich zum Wachstum auf Fruktose bzw. autotrophen Wachstums mit H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ....	114
3.2.5.3.	Verifizierung der Ergebnisse der Transkriptionsanalysen durch <i>real-time</i> RT-PCR .....	121
3.2.6.	Verwertung verschiedener Stickstoffverbindungen .....	122
3.2.7.	Verwertung verschiedener Zucker.....	123
3.2.7.1.	Wachstum auf Fruktose.....	123
3.2.7.2.	Wachstum auf Glukose .....	124
3.2.7.2.1.	Bestimmung von Fermentationsprodukten .....	125
3.2.7.2.2.	Transkriptionsanalysen bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zu Wachstum auf Fruktose.....	126
3.2.7.3.	Transkriptionsanalysen bei Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose.....	134
3.2.8.	Transkriptionsanalysen bei Wachstum auf D-Gluconat.....	138
3.3.	DNA-Transfer in <i>C. ljungdahlii</i> .....	142
3.3.1.	Vereinzelung von <i>C. ljungdahlii</i> .....	142
3.3.2.	Minimale Hemmkonzentration verschiedener Antibiotika bei <i>C. ljungdahlii</i>	144
3.3.3.	Veränderung des bestehenden Transformationsprotokolls.....	145
3.3.4.	Konjugation von <i>C. ljungdahlii</i> .....	145
3.3.5.	Verwendung verschiedener Gram-positiver <i>origins of replication</i> .....	147
3.3.6.	Suche nach einem negativen Selektionsmarker.....	149
3.3.6.1.	Sensitivität von <i>C. ljungdahlii</i> auf die Basenanaloga 5-Fluorouracil und Thioguanin .....	149
3.3.6.2.	Verwertung von Saccharose.....	150
3.3.6.3.	Verwendung von <i>sacB</i> als negativen Selektionsmarker .....	150
3.3.7.	Anpassung des ClosTron-Systems in <i>C. ljungdahlii</i> .....	152
3.3.7.1.	pMTL007-Plasmide .....	153
3.3.7.2.	Konstruktion von pCH5 und pCH6.....	154
3.3.7.3.	Insertion von Intron II in das Genom von <i>C. ljungdahlii</i> .....	157
3.4.	Untersuchungen zum Rnf-Komplex bei <i>C. ljungdahlii</i> : Bestimmung der Operonstruktur und des Transkriptionsstartpunkts .....	160
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>163</b>
4.1.	Das Genom von <i>C. ljungdahlii</i> .....	163
4.1.1.	Allgemeiner Vergleich des Genoms von <i>C. ljungdahlii</i> mit anderen Clostridien .....	163

4.1.2.	Das genetische Potential von <i>C. ljungdahlii</i> in Hinblick auf die Substratverwertung und Produktbildung .....	164
4.1.3.	Energiekonservierung von <i>C. ljungdahlii</i> im Vergleich mit <i>M. thermoacetica</i> und <i>A. woodii</i> .....	170
4.2.	Verifizierung des genetischen Potentials mittels Wachstumsversuchen und genomweiter Transkriptionsanalysen .....	176
4.2.1.	Autotrophes Wachstum .....	177
4.2.2.	Wachstum auf verschiedenen heterotrophen Substraten als C-Quelle .....	182
4.2.3.	Wachstum auf Betain und Ethanol – eine Stickland-analoge Reaktion .....	190
4.3.	Entwicklung und Etablierung von Methoden zum genetischen Arbeiten mit <i>C. ljungdahlii</i> .....	193
4.4.	Biotechnologisches Potential .....	197
4.5.	Ausblick .....	198
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>201</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>205</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>225</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>241</b>
	<b>Publikationen</b> .....	<b>243</b>
	<b>Danksagungen</b> .....	<b>245</b>



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	bis auf angegebenes Volumen auffüllen
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BiBaG	<i>Bidirectional blast for identification of Bacterial pan and core Genomes</i>
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary</i> )
CDS	kodierende Sequenz ("coding sequence")
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
CODH/ACS	CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ErmB	Erythromycin/Clarithromycin-Resistenzkassette
<i>et al.</i>	Und weitere ( <i>et alii</i> )
F	Farad
Fa.	Firma
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavonmononukleotid
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -Thiogalaktopyranosid
k	Kilo ( $10^3$ )
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
L	Liter
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase
LB	Luria Bertani
log	dekadischer Logarithmus
m	milli- ( $10^{-3}$ )/Meter
M	Molar (mol/l), Mega- ( $10^6$ )
MCS	Multiklonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
min	Minute
Mo	Molybdän
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

n	Nano- ( $10^{-9}$ )
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
<i>oriR</i>	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
<i>oriT</i>	Transferursprung ( <i>origin of transfer</i> )
p	pico ( $10^{-12}$ )
p.A.	<i>pro analysis</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PTS	Phosphotransferase System
r	resistent/Resistenz
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Schwefel
SDS	Natriumdeodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulfate</i> )
SLP	Substratlevelphosphorylierung
SOE	<i>Splicing with overlap extensions</i>
sp.	Spezies
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
THF	Tetrahydrofolat
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Einheit der Enzymaktivität ("unit")
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
μ	Mikro- ( $10^{-6}$ ), Wachstumsrate

Nukleotidbasen

A	Purinbase Adenin	G	Purinbase Guanin
C	Pyrimidinbase Cytosin	T	Pyrimidinbase Thymin

Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin





# 1. Einleitung

## Die Gattung *Clostridium*

Der Genus *Clostridium* ist eine sehr heterogene Gruppe an Organismen. Die gemeinsamen Charakteristika dieser Gattung sind der anaerobe Stoffwechsel, die Fähigkeit Endosporen zu bilden, der Gram-positive Zellwandaufbau und ihre Unfähigkeit zur dissimilatorischen Sulfat-Reduktion (Wiegel *et al.*, 1981). Durch 16S rRNA-Sequenzanalysen wurden die Mitglieder der Gattung in 19 Cluster eingeteilt, wobei die meisten pathogenen, aber auch viele nicht-pathogene Arten in Cluster I eingeordnet wurden (Collins *et al.*, 1994). Auch *C. ljungdahlii* wird anhand der 16S-Sequenzen zu Cluster I gezählt (Tanner *et al.*, 1993).

Clostridien sind bezüglich ihrer Physiologie sehr heterogen und besitzen ein breites Substratspektrum und große metabolische Vielfalt. Infolgedessen wurden die Vertreter dieser Gattung anhand ihrer bevorzugten Energie- und Kohlenstoffquelle in drei große Gruppen eingeteilt: proteolytische bzw. saccharolytische Clostridien und Spezialisten (Hippe *et al.*, 1992). Die proteolytischen Vertreter, zu deren Gruppe viele pathogene Arten wie *Clostridium tetani* oder *Clostridium botulinum* gehören, verwerten hauptsächlich einzelne Aminosäuren oder verschiedene Gruppen von Aminosäuren (Mead, 1971). Saccharolytische Clostridien wie *Clostridium acetobutylicum* vergären zahlreiche Kohlenhydrate zu organischen Säuren, Lösungsmittel, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> (Mitchell, 1992). *C. ljungdahlii* kann aufgrund seines homoacetogenen Stoffwechsels der Gruppe der Spezialisten zugeordnet werden.

## *Clostridium ljungdahlii*

Das homoacetogene Bakterium *Clostridium ljungdahlii* wurde aufgrund seiner Fähigkeit zur Bildung von Ethanol und Essigsäure aus Synthesegas (ca. 50-65% CO, 30-45% H<sub>2</sub>, 2-5% CO<sub>2</sub>) aus Hühnerkot bzw. -mist isoliert. Der Organismus ist jedoch nicht nur auf autotrophes Wachstum festgelegt, sondern kann neben Synthesegas und H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> auch verschiedene Zucker wie Fruktose, Glukose, D-Xylose oder L-Arabinose (Tanner *et al.*, 1993) nutzen. Die Hauptfermentationsprodukte sind Essigsäure und Ethanol. Da der Organismus durch die Fähigkeit Ethanol bei Wachstum auf Synthesegas zu produzieren, biotechnologisch überaus interessant ist, lag der Fokus der Forschung an *C. ljungdahlii* bisher auf der Erforschung des autotrophen Wachstums mit Synthesegas bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Dabei sollte das Verhältnis der Produkte Ethanol zu Essigsäure, das meist auf Seiten der Essigsäure liegt, zugunsten Ethanol

verschoben werden. Dazu wurde das Medium optimiert (Gaddy & Clausen, 1992; Klasson *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1994; Tanner *et al.*, 1993), der Gaspartialdruck verändert (Najafpour & Younesi, 2006; Younesi *et al.*, 2005), verschiedene artifizielle Elektronenakzeptoren zugegeben (Klasson *et al.*, 1993) bzw. der Organismus in kontinuierlicher Kultur kultiviert (Klasson *et al.*, 1993). Verschiedene Firmen (BRI Energy, LanzaTech) nutzen *C. ljungdahlii* auch schon in industriellen Versuchsanlagen, um Bioethanol aus Synthesegas herzustellen. Außerdem konnte in neuesten Forschungen gezeigt werden, dass der Organismus neben Ethanol und Essigsäure auch kleine Mengen an 2,3-Butandiol produzieren kann (Köpke *et al.*, 2011).

Neben seiner biotechnologischen Bedeutung ist *C. ljungdahlii* aber auch aufgrund seines homoacetogenen Stoffwechsels interessant. In der Gruppe der Bakterien werden anaerobe Prokaryoten zusammengefasst, die Acetat als Stoffwechselendprodukt bilden und CO<sub>2</sub> als terminalen Elektronenakzeptor nutzen können. Charakteristisch für diesen Stoffwechsel ist die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu Acetat durch den reduktiven Acetyl-CoA- oder Wood-Ljungdahl-Weg, durch den diese Form der Acetogenese von anderen abgegrenzt wird. Erstmals wurde die H<sub>2</sub>-abhängige Reduktion von CO<sub>2</sub> zu Acetat durch Mikroorganismen in Abwässern 1932 beschrieben (Fischer F. *et al.*, 1932). Mit *Clostridium aceticum* und *Clostridium thermoaceticum* konnten in der Folge die ersten homoacetogenen Bakterien isoliert und charakterisiert werden (Fontaine F.E. *et al.*, 1942; Wieringa, 1939). Gegenwärtig werden Vertreter von 21 Gattungen zur Gruppe der Homoacetogenen gerechnet (Drake H.L. *et al.*, 2004), darunter *Moorella* (mit Vertretern wie *Moorella thermoautotrophicum* (Wiegel *et al.*, 1981) und *Moorella thermoacetica* (Fontaine F.E. *et al.*, 1942)), *Eubacterium* (z.B. *Eubacterium limosum* (Genthner *et al.*, 1981)), *Blautia* (z.B. *Blautia producta* (Lorowitz & Bryant, 1984)) oder *Acetobacterium* (z.B. *Acetobacterium woodii* (Balch W.E., 1977)). Die meisten dieser Bakterien können jedoch nicht nur autotroph kultiviert werden, sondern sind stoffwechselphysiologisch äußerst vielseitig. Neben CO und Formiat als Einkohlenstoffverbindungen können diese Bakterien Alkohole (z.B. Methanol, Ethanol), Aldehyde (z.B. Glyoxylat, Benzaldehyd), Carbonsäuren (z.B. Pyruvat, Gluconat), Methylgruppen methoxylierter, aromatischer Verbindungen (z.B. Ferulat) oder auch zahlreiche Hexosen als Kohlenstoffquelle nutzen (Drake H.L. *et al.*, 2004).

Homoacetogene Bakterien spielen auch eine wichtige Rolle im Kohlenstoffkreislauf der Erde. Es wird geschätzt, dass mindestens 10% des Acetats, das in terrestrischen Habitaten wie Böden oder Sedimenten gebildet und weiterverwertet wird, durch CO<sub>2</sub>-Fixierung via des

Wood-Ljungdahl-Wegs produziert wird (Wood & Ljungdahl, 1991). Ebenso wie in terrestrischen Habitaten kommen homoacetogene Bakterien im Verdauungstrakt von Menschen und verschiedener Tiere vor (Bernalier *et al.*, 1996; Greening & Leedle, 1989; Leadbetter *et al.*, 1999; McInerney & Bryant, 1981). Sie verringern die Menge der Gase  $H_2$  und  $CO_2$  und produzieren Acetat, das von den Zellen aufgenommen und wiederum als Energiequelle dienen kann (Bernalier *et al.*, 1996). Termiten decken beispielsweise ca.  $\frac{1}{3}$  ihres Energiebedarfs durch Acetat, das durch die Reduktion von  $CO_2$  mit  $H_2$  durch Homoacetogene gebildet wurde (Breznak & Brune, 1994).

Somit ist das durch Homoacetogenese produzierte Acetat ein essentieller Bestandteil der Nahrungskette und die Organismen leisten einen wichtigen Beitrag im Kohlenstoffkreislauf in anoxischen Habitaten (McInerney & Bryant, 1981).

#### Wood-Ljungdahl-Weg:

Durch die Reaktionen des Acetyl-CoA-Wegs können homoacetogene Bakterien autotroph auf  $H_2 + CO_2$  wachsen. Der Großteil der Reaktionen dieses Stoffwechselwegs wurde an *M. thermoacetica* als Modellorganismus untersucht und charakterisiert. Entscheidenden Anteil an der Aufklärung hatten die beiden Forscher Lars G. Ljungdahl und Harland G. Wood, zu deren Ehren dieser Stoffwechselweg auch Wood-Ljungdahl-Weg genannt wird. In einem ersten Schritt wird  $CO_2$  mittels einer Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert. In *M. thermoacetica* besteht dieses Enzym aus einem  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer, das neben Fe-S-Zentren zusätzlich Wolfram und Selen enthält (Yamamoto *et al.*, 1983). Das freie Intermediat Formiat wird von der Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase auf den Cofaktor Tetrahydrofolat übertragen. Dies ist ein endergoner Prozess, bei dem ein ATP verbraucht wird (Lovell *et al.*, 1988, 1990). Die an Tetrahydrofolat gebundene Formyl-Gruppe wird sukzessive zu einer Methylgruppe reduziert, welche die Vorstufe der Methylgruppe des Acetats darstellt. Eine Methyltransferase überträgt den Methylrest auf ein Corrinoid-Fe-S-Protein (Banerjee & Ragsdale, 2003; Drake *et al.*, 1981; Ragsdale & Pierce, 2008; Roberts *et al.*, 1989; Seravalli *et al.*, 1999a; Seravalli *et al.*, 1999b; Wirt *et al.*, 1995), das seinerseits die CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase methyliert. Die CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase stellt das Schlüsselenzym des Wood-Ljungdahl-Wegs dar (Diekert & Thauer, 1978; Hu *et al.*, 1984) und ist ein  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer (Darnault *et al.*, 2003; Doukov *et al.*, 2000; Ragsdale *et al.*, 1983). Die  $\beta$ -Untereinheit reduziert  $CO_2$  und liefert das benötigte CO, das die

## Einleitung

Vorstufe der Carbonylgruppe des Acetyl-CoA darstellt. Die  $\alpha$ -Untereinheit katalysiert die Synthese von Acetyl-CoA aus CoA, der gebundenen Methylgruppe und CO (Barondeau & Lindahl, 1997; Pezacka & Wood, 1984a; Pezacka & Wood, 1984b; Ragsdale & Kumar, 1996; Raybuck Scott A. *et al.*, 1988; Seravalli *et al.*, 1997). Das dabei entstehende Acetyl-CoA dient entweder als Kohlenstoffquelle für anabole Prozesse oder wird über Acetylphosphat zu Acetat umgesetzt (Eden & Fuchs, 1982).

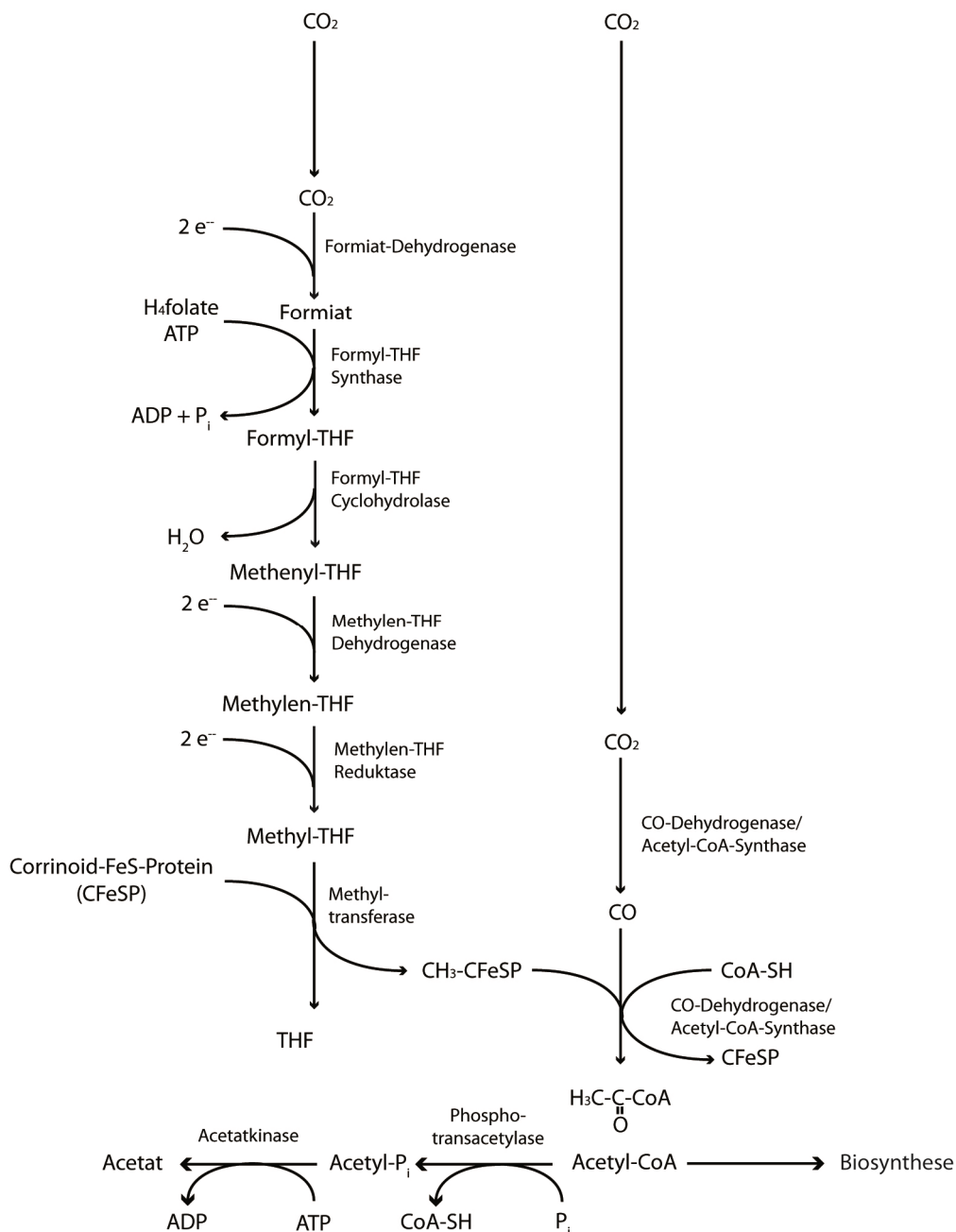
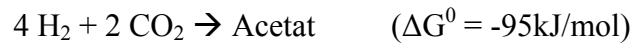


Abb. 1: Der Wood-Ljungdahl-Weg; THF: Tetrahydrofolat

### Bioenergetik des Wood-Ljungdahl-Wegs

Bei chemolithoautotrophen Wachstum wird bei homoacetogenen Bakterien ausschließlich der Wood-Ljungdahl-Weg nach folgender Umsatzgleichung genutzt:

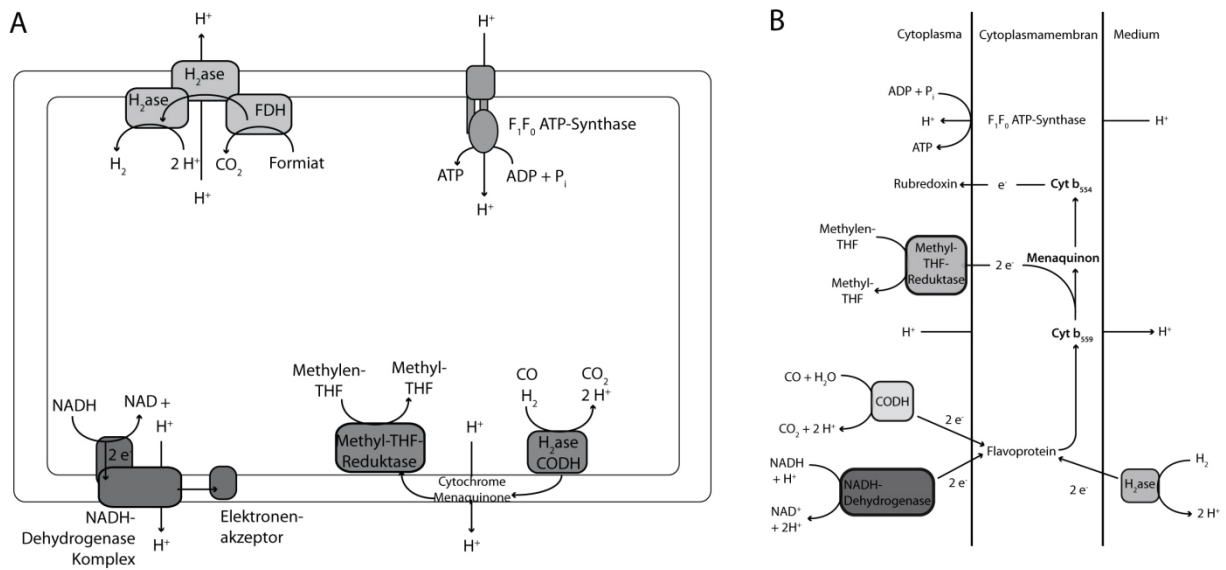


Im Verlauf dieses Stoffwechselwegs erfolgt keine Netto-ATP-Synthese durch Substratkettenphosphorylierung, wie aus Abb. 1 zu entnehmen ist. Das durch die Reaktion der Acetatkinase gewonnene ATP wird bei der Aktivierung des Formiats wieder verbraucht. Daher kann ATP-Synthese bei Wachstum mit  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  nur durch chemiosmotische Prozesse erfolgen. Bisher sind zwei verschiedene Mechanismen der Energiekonservierung durch chemiosmotische Prozesse bei Acetogenen bekannt. Auf der einen Seite steht *M. thermoacetica*, das einen protonenabhängigen Energiestoffwechsel mit membrangebundenen Quinonen und Cytochromen besitzt, auf der anderen Seite  $\text{Na}^+$ -abhängige Organismen wie *A. woodii*, die membrangebundene Corrinoid-Proteine und einen Rnf-Komplex aufweisen.

### Energiekonservierung in *M. thermoacetica*

Baronofsky *et al.* (1984) konnten zeigen, dass *M. thermoacetica* ein auf Protonen basierendes elektrochemisches Membranpotential ausbildet. Des Weiteren konnte eine  $\text{H}^+$ -abhängige  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase isoliert werden (Das & Ljungdahl, 1997). In Membranfraktionen des Organismus konnten Menaquinon MK-7 und die Typ-B Cytochrome  $b_{559}$  und  $b_{554}$ , Ferredoxin und Rubredoxin identifiziert werden, die als Elektronenüberträger von  $\text{H}^+$ -abhängigen, chemiosmotischen Prozessen zur Energiekonservierung dienen und somit Bestandteile einer Elektronentransportkette sein könnten (Das *et al.*, 1989; Gottwald *et al.*, 1975; Hugenholtz *et al.*, 1987) Welche Komponenten als Elektronendonatoren oder -akzeptoren an einer Elektronentransportkette beteiligt sein könnten, ist bisher allerdings nicht bekannt. Bei einem Aufschluss von Zellen mittels einer „French Press“ waren alle Enzyme des Wood-Ljungdahl-Wegs in der löslichen, cytoplasmatischen Fraktion zu finden. Der Nachteil dieser Aufschlussmethode ist, dass membrangebundene Enzyme möglicherweise von der Membran abgeschert werden. Bei Anwendung alternativer, „sanfterer“ Aufschlussverfahren wurde festgestellt, dass einige Enzyme des Wood-Ljungdahl-Wegs zumindest mit der Membran assoziiert sind. Bei diesen Experimenten konnten an Membranvesikeln Aktivitäten einer

NADH-Dehydrogenase, einer Hydrogenase, der CO-Dehydrogenase und Methylen-THF-Reduktase nachgewiesen werden (Hugenholtz *et al.*, 1987; Hugenholtz & Ljungdahl, 1989). Außerdem wurde gezeigt, dass eine Inkubation der Membranfraktionen mit CO-Dehydrogenase- und Methylen-THF-Reduktase-Aktivität mit CO oder Dithionit mit der Generierung eines transmembranen  $H^+$ -Gradienten einhergeht und eine Reduktion des Cytochroms  $b_{559}$  bewirkt, gefolgt von einer Reduktion des Menaquinons und Cytochrom  $b_{554}$  (Hugenholtz *et al.*, 1987). Ljungdahl schlug vor, dass in *M. thermoacetica* eine Elektronentransportkette mit folgenden Schritten vorliegt: in einem ersten Schritt wird CO oxidiert, was gekoppelt ist mit der Bildung von NADH durch ein Flavoprotein. Anschließend erfolgt eine Reduktion von Cyt  $b_{559}$ , das wiederum Methylen-THF bzw. das Menaquinon und Cyt  $b_{554}$  reduzieren könnte. In einem finalen Schritt in der Elektronentransportkette würde ein Rubredoxin reduziert werden (siehe Abb. 2). Jedoch ist der Schritt der vorgeschlagenen Elektronentransportkette, bei dem Protonen aus der Zelle geschleust werden, noch immer nicht bekannt (Ragsdale & Pierce, 2008).



**Abb. 2: Modell der Bioenergetik in *M. thermoacetica* nach Ragsdale & Pierce (2008):** **A:** Proteinkomplexe, die vermutlich in den Protonentransfer in *M. thermoacetica* involviert sind; **B:** Modell einer Elektronentransportkette in *Moorella*-Arten nach bisherigen Ergebnissen. Der Protonen-translozierende Schritt darin ist nicht bekannt

### Energiekonservierung bei *A. woodii*

Bei *A. woodii* (Heise *et al.*, 1989) oder auch *Thermoanaerobacter kivui* (Yang & HL, 1990) konnte eine strikte Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit der Acetogenese und des autotrophen Wachstums gezeigt werden. Dabei werden Reaktionen des Wood-Ljungdahl-Wegs mit der Generierung eines primären transmembranen Na<sup>+</sup>-Potentials gekoppelt (Heise *et al.*, 1989). Des Weiteren wurden membrangebundene Corrinoid-Proteine in *A. woodii* entdeckt (Dangel *et al.*, 1987). Diese Entdeckung sowie zahlreiche Analogien der CO<sub>2</sub>-Reduktionswege in Homoacetogenen und Methanogenen führten zu der Hypothese, dass der Transfer der Methylgruppe von Methyl-THF auf CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase mit der Translokation von Na<sup>+</sup> einhergeht (Müller V. & Gottschalk, 1994). Der Enzymkomplex, der für den Aufbau des Na<sup>+</sup>-Gradienten verantwortlich ist, war aber lange nicht bekannt. Erst durch die kürzliche Entdeckung eines Rnf-Komplexes in *A. woodii* konnte ein weiterer Baustein in der Aufklärung der Energiekonservierung in Homoacetogenen identifiziert werden (Biegel *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass der Rnf-Komplex eine Ferredoxin:NADH-Oxidoreduktase-Aktivität besitzt und dadurch Elektronen von Ferredoxin auf NAD<sup>+</sup> übertragen werden, bei gleichzeitiger Translokation von Na<sup>+</sup>-Ionen über die Membran (Biegel & Müller, 2010; Biegel *et al.*, 2009). Die Veröffentlichung des Genoms von *A. woodii* konnte weiter Aufschluss über die Energiekonservierung geben (Poehlein *et al.*, 2012). Aus diesen neueren Erkenntnissen folgt ein neues Modell der Energiegewinnung in *A. woodii*. Ferredoxin wird reduziert durch Übertragung von Elektronen von Donatoren (z.B. Fruktose oder H<sub>2</sub>) und wird wiederum am Rnf-Komplex oxidiert. Die Elektronen werden dabei über verschiedene Fe-S- bzw. FMN-Cluster des Komplexes auf NAD<sup>+</sup> übertragen. Dabei werden Na<sup>+</sup>-Ionen über die Membran transloziert (Poehlein *et al.*, 2012).

### Rnf-Komplex

Der membrangebundene Rnf-Komplex hat eine große Ähnlichkeit zu einer Na<sup>+</sup>-translozierenden NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase, von der bekannt ist, dass sie den Elektronenfluss von NADH zu Quinon mit der elektrogenen Translokation von Na<sup>+</sup> über die Membran koppelt. Daher wird vermutet, dass der Rnf-Komplex ebenfalls eine Ionen-Pumpe darstellt (Schmehl *et al.*, 1993). Gene für einen Rnf-Komplex wurden zuerst in *Rhodobacter capsulatus* entdeckt (Jouanneau *et al.*, 1998; Schmehl *et al.*, 1993) und seitdem wurden Homologe in vielen anderen Bakterien gefunden (Brüggemann *et al.*, 2003; Curatti *et*

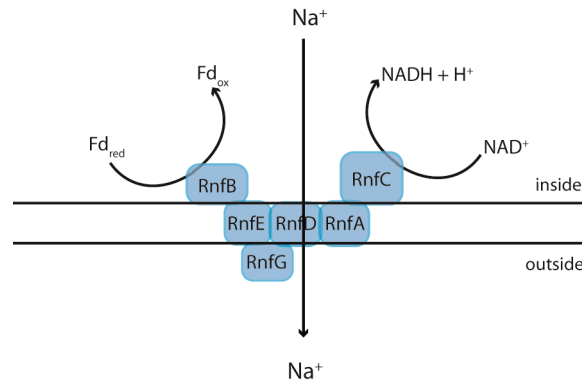
*al.*, 2005; Koo *et al.*, 2003; Köpke *et al.*, 2010; Seedorf *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2008). Der Rnf-Komplex besteht meist aus sechs Proteinen, welche die Übertragung von Elektronen von Ferredoxin auf  $\text{NAD}^+$  katalysieren, bei gleichzeitiger Translokation von Ionen über die Membran, so dass ein elektrochemischer Gradient aufgebaut wird (Abb. 3). An dem löslichen RnfB-Protein, das eine Polyferredoxin-ähnliche Domäne besitzt, wird vermutlich das Ferredoxin oxidiert und dabei die Elektronen auf RnfB übertragen. Anschließend werden die Elektronen über eine Elektronentransportkette über die Kofaktoren FMN von RnfD und RnfG auf ein Fe-S-Cluster von RnfC übertragen. Das membranassoziierte RnfC besitzt zusätzlich eine NADH-Bindestelle, so dass die Elektronen von diesem Protein auf  $\text{NAD}^+$  übertragen werden. RnfA und RnfE sind integrale Membranproteine und besitzen keine Bindestelle für Kofaktoren. Ihre Aufgabe könnte die Stabilisierung des Enzymkomplexes sein, bzw. könnten sie mit RnfD den Transportkanal für Ionen bilden (Biegel *et al.*, 2011). Der Mechanismus der Ionentranslokation ist weiter unbekannt, aber ein Pumpmechanismus über eine Konformationsänderung wie bei Komplex I der Atmungskette von Mitochondrien oder Bakterien (Kerscher *et al.*, 2008) ist am wahrscheinlichsten (Biegel *et al.*, 2011).

Der Rnf-Komplex nutzt den Unterschied im Redoxpotential zwischen Ferredoxin und NADH, wodurch ein negativer Redoxbereich von -500 bis -420 mV (Ferredoxin) bis -320 mV (NADH) ausgenutzt wird. Dieser Unterschied im Redoxpotential ist äquivalent zu -20 bis -35 kJ/mol, was dem Transport von 1-2 Ionen über die Membran entspricht. Da für die Synthese von 1 ATP durch die ATP-Synthase 3 Ionen benötigt werden, werden  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{2}{3}$  mol ATP je ein mol reduziertem Ferredoxin synthetisiert (Poehlein *et al.*, 2012).

In verschiedenen Organismen scheint der Rnf-Komplex unterschiedliche Rollen zu haben. Bei *R. capsulatus* spielt dieser Enzym-Komplex eine wichtige Rolle in der Generierung von reduziertem Ferredoxin, das als Donor für den Nitrogenase-Komplex zur  $\text{N}_2$ -Fixierung dient (Schmehl *et al.*, 1993). Auch in *Pseudomonas stutzeri* (Desnoves *et al.*, 2003) und *Azotobacter vinelandii* (Curatti *et al.*, 2005) spielt der Rnf-Komplex eine Rolle in der  $\text{N}_2$ -Fixierung. In *Escherichia coli* existiert ein homologes System namens Rxs, das in die Zellantwort auf oxidativen Stress involviert ist und Elektronen auf SoxR überträgt und somit diesen Regulator reduziert (Koo *et al.*, 2003). In *Vibrio cholerae* ist die Funktion des Rnf-Komplex nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass er zur Produktion von sogenannten „low redox“-Elektronen genutzt wird, um zelluläre Komponenten zu reduzieren, die in Signalwegen, Stressantwort oder anderen physiologischen Aktivitäten involviert sind (Backiel *et al.*, 2008). Bei *A. woodii* wurde gezeigt, dass bei der Reduktion von Ferredoxin ein



Natrium-Ionengradient über die Membran aufgebaut wird (Biegel & Müller, 2010). Damit wäre der Rnf-Komplex ein wichtiger Bestandteil in der Bioenergetik bei autotrophen Wachstum in einem Teil der homoacetogenen Bakterien (Biegel *et al.*, 2011).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Rnf-Komplex nach Biegel *et al.* (2010);** Der Rnf-Komplex überträgt Elektronen von Ferredoxin auf  $\text{NAD}^+$  bei simultanem Transport von  $\text{Na}^+$ -Ionen über die Membran zum Aufbau eines Ionengradienten. Fd: Ferredoxin

### Genomsequenzierung

Die Sequenzierung und Analyse vollständiger Genome ist noch eine relativ junge Disziplin in der biologischen Forschung. Den Beginn der Genomforschung markierte 1995 die Entschlüsselung des Genoms von *Haemophilus influenzae* als erstes bakterielles Genom (Fleischmann *et al.*, 1995). 2002 konnte die Sequenz des menschlichen Genom vollständig aufgeklärt werden (Lander E.S. *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Durch die Weiterentwicklung der klassischen Sanger-Sequenzierung zu Next-Generation-Sequencing-Technologien können immer mehr Genome in immer kürzerer Zeit entschlüsselt werden, wodurch immer größere Datenmengen zur Verfügung stehen. Diese Datenmengen müssen bioinformatisch analysiert werden, um Rückschlüsse auf z. B. Verwandtschaftsverhältnisse und lateralen Gentransfer ziehen zu können oder um den Stoffwechsel rekonstruieren zu können und somit Kenntnisse über biologisch und z. T. medizinisch relevante Eigenschaften zu erlangen. Zu den wichtigsten Schritten gehört die Annotation, d. h. die Identifizierung von kodierenden offenen Leserahmen (ORFs: *open reading frames*) sowie die Zuweisung möglicher Funktionen dieser potentiellen Gene. Dabei werden zuerst durch eine automatische Annotation ORFs, Ribosomenbindestellen bzw. RNAs identifiziert und die Funktion von potentiellen Proteinkodierenden Genen durch Homologievergleiche bestimmt. Hierzu

kommen bioinformatische Programme, z. B. Glimmer oder Critica zum Einsatz. Jedoch wird für eine Vielzahl der Genomprojekte zusätzlich eine manuelle Annotation durchgeführt. Der Grund hierfür liegt in ein aktuellen Gen-Vorhersageverfahren, die nicht nur artifizielle Gene erzeugen, sondern auch in einem erheblichen Maß Gene übersehen bzw. Selenoproteine nicht korrekt identifizieren. Dies kann bei der manuellen Annotation korrigiert werden. Ebenso wie bei der ORF-Identifizierung ist eine manuelle Annotation bei der Zuweisung einer möglichen Funktion unerlässlich. In diesem Schritt werden die Aminosäuresequenzen der abgeleiteten Genprodukte mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen und nach bekannten Motiven oder enthaltenen Domänen gesucht. Im Gegensatz zur automatischen Annotation werden bei der manuellen Annotation zusätzlich der Gen-Kontext berücksichtigt und Ähnlichkeiten zu in der Literatur beschriebenen und biochemisch nachgewiesenen Enzymen stärker berücksichtigt.

Mit Hilfe der durch die Sequenzierung und Annotation gewonnenen Daten kann eine Rekonstruktion des Stoffwechsels vorgenommen werden. Hierbei werden anhand der im Genom identifizierten Gene mögliche Stoffwechselwege bzw. –prozesse rekonstruiert, über die Substrate abgebaut oder Stoffe synthetisiert werden können. Zusätzlich können neue potentielle Substrate identifiziert werden, die eventuell verwertet werden können.

Durch die Genomsequenzierung und –annotation können schon bekannte Ergebnisse bestätigt werden oder neue Ansatzpunkte für weitere Projekte bieten. Die vollständige Sequenzierung eines Genoms ist auch die Basis für die Konstruktion von DNA-Microarrays, mit denen man u. a. die Genexpressionsmuster von einzelnen Organismen *in vivo* unter verschiedenen Umweltbedingungen untersuchen kann.

### DNA-Microarray-Technologie:

Die DNA-Microarray-Technologie entwickelte sich aus den klassischen *Southern-* und *Northern-Blot*-Untersuchungen für die Detektion spezifischer DNA und mRNA (Alwine *et al.*, 1979; Alwine *et al.*, 1977; Southern, 1975). Microarrays sind dazu geeignet in einem Experiment das Genexpressionsmuster zehntausender Gene zu untersuchen, wobei durch die zunehmende Automatisierung von Laborroutinen auch die Aufbringung von bis zu 50000 DNA-Fragmenten auf einen einzelnen Mikroskop-Objektträger möglich ist (DeRisi *et al.*, 1996; Shalon D. *et al.*, 1996). Diese als *probes* bezeichneten immobilisierten DNA-Fragmente werden mit sogenannter *target* cDNA von zwei verschiedenen Versuchsbedingungen hybridisiert, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Dabei wird meist das

Expressionsmuster bei Wachstum unter bestimmten Umweltbedingungen gegen jenes einer definierten Referenzbedingung verglichen. Dadurch bekommt man Momentaufnahmen der gesamten genetischen Aktivität des Bakteriums unter gegebenen Bedingungen zum Zeitpunkt der Zellernte.

Diese Untersuchung der Genexpressionsmuster einzelner Organismen *in vivo* unter verschiedenen Umweltbedingungen ist nur eine Anwendungsmöglichkeit der Microarray-Technologie. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit stellt das *genomotyping* dar. Bei *genomotyping* oder auch *comparative genomics* werden die Genome von verschiedenen Stämmen einer Art mit Hilfe eines kombinierten DNA-Microarrays mit Sonden für alle (einzigartigen) Gene auf DNA-Ebene verglichen (Lepage *et al.*, 2006).

Zielsetzung:

Bisher wurde *C. ljungdahlii* meist nur hinsichtlich einer Optimierung der Ethanolproduktion untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch ein möglichst breites Spektrum seines Stoffwechsels erforscht werden. Dafür sollte zuerst das Genom nach der Sequenzierung annotiert und das genetische Potential analysiert werden. Auf Basis der Sequenzierung und Annotation sollte ein DNA-Microarray konstruiert werden, um mit Hilfe von Transkriptionsanalysen eine Aussage über unterschiedliche Genexpressionsmuster beim Verbrauch von verschiedenen Substraten treffen zu können. Zusätzlich sollte beim Wachstum auf ausgewählten Substraten der Verbrauch und die Bildung der Stoffwechselprodukte über den Wachstumsverlauf gemessen werden. Des Weiteren sollten Grundlagen für zukünftige genetische Arbeiten an *C. ljungdahlii* geschaffen werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Gase, Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Gase für anaerobes Arbeiten bzw. Analysen durch Ionenchromatographie und Gaschromatographie wurden von der Firma AirLiquide AG (Düsseldorf) geliefert.

Wenn nicht anders aufgeführt wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Merck KGaA (Darmstadt), Riedel de Hën AG (Seelze), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) oder Applichem (Darmstadt) bezogen und besaßen mind. p. a.-Qualität. Enzyme wurden bis auf die unten genannten Ausnahmen von der Fermentas GmbH (St.Leon-Rot) bezogen.

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

---

#### Chemikalien:

50x Denhart's Solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bacteriological Agar No. 1	Oxoid, Hampshire, UK
Thiamphenicol	Molecula, Manchester, UK

---

#### Enzyme:

<i>Bsr</i> GI	NEB, Frankfurt am Main
<i>Hind</i> III	NEB, Frankfurt am Main
Turbo DNase	Ambion, Huntington/Austin, TX, USA
DNase (10U/ $\mu$ L)	Roche, Mannheim
random hexamers p(dN <sub>6</sub> )	Roche, Mannheim
dNTP-Mix	Roche, Mannheim
Phire Hot-Start II DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	Quiagen, Hilden
Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step	Stratagene, LaJolla, USA
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Cy <sup>TM</sup> 3-dCTP bzw. Cy <sup>TM</sup> 5-dCTP	GE Healthcare Europe GmbH, München

---

#### Kits:

AxyPrep <sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Mannheim
Master Pure DNA Purification Kit	Epicentre, Madison, USA
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
FirstChoice® RLM RACE Kit	Ambion, Huntington/Austin, TX, USA
illustra <sup>TM</sup> CyScribe <sup>TM</sup> GFX <sup>TM</sup> Purification Kit	GE Healthcare Europe GmbH, München

---

## Material und Methoden

---

### Geräte:

---

Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories, California USA
Tischzentrifuge	Haereus Holding GmbH, Hanau
Magnet-Heizrührer	JAK Werk, Staufen
Anaerobenkammer	Töpffer lab systems, Göppingen
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Göttingen
UV/VIS-Spektrometer Ultrospec®3300pro	Amersham Pharmacia Biotech
Alpha Imager Mini	Biozym, Hess. Oldendorf
Mikro-Dismembrator U,	Braun Biotech, Melsungen
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Primus HT	MWG AG Biotech, Ebersberg
FlexCycler	Jena Analytik, Jena
iCycler iQ Real-timePCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, California USA
Automated Slide Processor	ASP Lucidea, Amersham Pharmacia Biotech
Tecan Hybridization Station HS400Pro	Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Österreich
Scanner GenePix 4000B	Axon Instruments, Union City, USA

---

## 2.2. Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet, die in Tab. 1 aufgeführt sind.

**Tab. 1: Verwendete Organismen**

Stamm	Geno-/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>Clostridium ljungdahlii</i> PETC (DSM 13528 = ATCC 55383™)	Typstamm	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>dlacIqZ_M15_(lacZYA-argF)</i> U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>RP4-2</i> (Km::Tn7,Tc::Mu-1), <i>LAMpir</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>creC510</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>Escherichia coli</i> ER2275	<i>trp-31</i> , <i>his-1</i> , <i>tonA2</i> , <i>rpsL104</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>metB1</i> , E14-, $\Delta$ ( <i>lac</i> )U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , R( <i>zbgZ10::Tn10</i> )Tcs, $\Delta$ ( <i>mcr-hsd</i> <i>mrr</i> )114::1510, [F' <i>proAB</i> , <i>lacIqZ</i> $\Delta$ M15, <i>zzd::mini</i> , Tn10(Kmr)]	Prof. E.T. Papoutsakis, Northwestern University, Evanston, USA
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (pIM13)	(pIM13) <i>Em leuB trpC</i>	(Monod <i>et al.</i> , 1986)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (pUB110) DSM 4514	(pUB110) <i>Km Nm thr-5 trpC2</i>	(Keggins <i>et al.</i> , 1978)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (pBC16) DSM 23521	(pBC16) <i>Tc trpC2</i>	(Bernhard <i>et al.</i> , 1978)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> SA1494 (pT181cop- 608)	(pT181cop-608)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig

## 2.3. Verwendete Plasmide

**Tab. 2: Verwendete Plasmide**

Vektor	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pBR322	4,4	Amp <sup>R</sup> ; Tc <sup>R</sup> , oripBR322	(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)
pUC19	2,7	Amp <sup>r</sup> ; lacPOZ <sup>c</sup> ; pMB1 oriR	(Vieira & Messing, 1982)
pACYC184	4,2	oriP15A, Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	(Chang & Cohen, 1978)
pK19mobSacB	5,7	oripMB1, Kan <sup>R</sup> , lacZ <sup>c</sup> , sacB	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pMAD	9,7	oripE194ts, oripBR322, <i>pclpB</i> , <i>bgaB</i> , <i>bla</i> , <i>ermC</i>	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pKVM1	10,4	pMAD-Derivat, oriT, <i>traJ</i>	(Rachinger, 2010)
pIM13	2,2	ermC <sup>r</sup> , oripIM13 (repL)	(Monod <i>et al.</i> , 1986)
pUB110	4,5	oripUB110, Kan <sup>R</sup>	(Keggins <i>et al.</i> , 1978)
pBC16	4,6	oripUB110, Tc <sup>R</sup>	(Bernhard <i>et al.</i> , 1978)
pKV12	15,9	oripAMβ1, oripBR322, oriT, Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	(Stratz <i>et al.</i> , 1994)
pT181cop-608	4,2	oripT181 (repC), Tc <sup>R</sup> , pre	(Khan S. A. <i>et al.</i> , 1981)
pJIR750	6,6	Cm <sup>r</sup> ; lacZ <sup>c</sup> ; oripMB1; oripIP404	(Bannam & Rood, 1993)
pMTL007	11,8	Cm <sup>R</sup> ; oripMB1/ColE1, oripCB102, oriT, <i>ltrAB</i>	(Heap <i>et al.</i> , 2007)
pMTL007C-E2	9,0	Cm <sup>R</sup> ; oripMB1/ColE1, oripCB102, oriT, <i>ltrAB</i>	(Heap <i>et al.</i> , 2010)
pMTL500e		oripAMβ1, oripBR322, Erm <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , lacZ <sup>c</sup>	(Swinfield <i>et al.</i> , 1991)
pSOS95	7,0	oripIM13, oripMB1, Amp <sup>R</sup> , ErmC <sup>R</sup> , <i>pthI</i>	(Tummala <i>et al.</i> , 1999)
pIMP1	4,7	Em <sup>r</sup> (ermC); Amp <sup>r</sup> ; pMB1 oriR; pIM13 oriR(+)	(Mermelstein <i>et al.</i> , 1992)
pIMP1catP	5,6	pIMP1 mit <i>catP</i> von pJIR750	diese Arbeit
pIMP1oriT	5,4	pIMP1 mit oriT von pKVM1	diese Arbeit
pIMP1catPoriT	6,3	pIMP1 mit <i>catP</i> von pJIR750 und oriT von pKVM1	diese Arbeit
pCH1	4,3	Hybrid von pUC19 und pIM13	diese Arbeit
pSOSsacB	6,4	pSOS95, <i>sacB</i> von pK19mobsacB	diese Arbeit
pCH2	5,8	pCH1, <i>sacB</i> von pK19mobsacB	diese Arbeit
pCH3	5,5	Hybrid von pBR322 und pUB110	diese Arbeit
pMTL007Prnf_reg	8,1	Derivat von pMTL007 mit Austausch des Promotors von <i>ltnB</i>	diese Arbeit
pMTL007C-E2_rnfC_283	9,0	pMTL007C-E2, spezifisch für Insertion in <i>rnfC</i>	diese Arbeit
pMTL007C-E2_rnfC_574	9,0	pMTL007C-E2, spezifisch für Insertion in <i>rnfC</i>	diese Arbeit
pMTL007C-E2_Betred_246	9,0	pMTL007C-E2, spezifisch für Insertion in Betainreduktase	diese Arbeit
pMTL007C-E2_Betred_616	9,0	pMTL007C-E2, spezifisch für Insertion in Betainreduktase	diese Arbeit



Vektor	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pMTL007Prnf_reg_rnfC_283	8,1	pMTL007Prnf_reg, spezifisch für Insertion in <i>rnfC</i>	diese Arbeit
pMTL007Prnf_reg_rnfC_574	8,1	pMTL007Prnf_reg, spezifisch für Insertion in <i>rnfC</i>	diese Arbeit
pMTL007Prnf_reg_Betred_246	8,1	pMTL007Prnf_reg, spezifisch für Insertion in Betainreduktase	diese Arbeit
pMTL007Prnf_reg_Betred_616	8,1	pMTL007Prnf_reg, spezifisch für Insertion in Betainreduktase	diese Arbeit
pCH1_ErmCppta	4,5	pCH1 mit Promotor von <i>pta</i> aus <i>C. ljungdahlii</i> vor <i>ermC</i>	diese Arbeit
pCH3_KanRppta	5,7	pCH3 mit Promotor von <i>pta</i> aus <i>C. ljungdahlii</i> vor <i>KanR</i>	diese Arbeit
pUC19_Intron	4,7	pUC19 mit <i>ltrB</i>	diese Arbeit
pUC19_Intron_RAMprnf reg	4,5	pUC19 mit <i>ltrB</i> , Austausch von <i>thl</i> -Promotor gegen Prnf reg	diese Arbeit
pUC19_Intronppta_RAMprnf reg	4,7	pUC19 mit <i>ltrB</i> , Austausch Promotor von <i>ltrB</i> gegen Promotor von <i>pta</i> aus <i>C. ljungdahlii</i>	diese Arbeit
pCH3_KanRppta_ltrA	7,9	pCH3_KanRppta mit <i>ltrA</i>	diese Arbeit
pCH3_KanRppta_ltrAppta	8,0	pCH3_KanRppta mit <i>ltrA</i> , Austausch des Promotors vor <i>ltrA</i> gegen Ppta aus <i>C. ljungdahlii</i>	diese Arbeit
pCH5	10,2	pCH3_KanRppta_ltrAppta mit <i>ltrBppta</i>	diese Arbeit
pCH6	9,7	pCH5 mit oripIM13	diese Arbeit
pCH7	5,0	pCH1 mit oripT181cop-608	diese Arbeit
pCH8	6,0	pCH1 mit oripIP404	diese Arbeit
pCH9	6,6	pKVM12 mit oripAMβ1	diese Arbeit

## 2.4. Zellanzucht

### 2.4.1. Nährmedien

Alle aufgeführten Medien wurden mit Milipore-H<sub>2</sub>O angesetzt und durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugegeben. Thermolabile Substanzen, wie beispielsweise Antibiotika, und C-Quellen wurden gelöst und sterilfiltriert. Antibiotika wurden dem Festmedium nach Abkühlen auf unter 55°C zugegeben. Flüssigmedien wurden die Zusätze direkt vor Gebrauch zugegeben.

### 2.4.1.1. *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

*E. coli* und *B. subtilis* wurden standardmäßig in LB-Medium angezogen. Mediumzusätze wurden wie in 2.4.2 beschrieben entsprechend der Konzentrationen aus Tab. 3 zugegeben.

<b>Lurani-Bertani-Medium (LB) (Sambrook, 2001)</b>	
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

### 2.4.1.2. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* wurde in DSMZ-Medium 1 bei 37°C aerob angezogen.

<b>Medium für <i>S. aureus</i></b>	
Pepton	5 g
Fleischextrakt	3 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
Medium auf pH 7,0 einstellen	

### 2.4.1.3. *Clostridium ljungdahlii*

*C. ljungdahlii* wurde bei 37°C anaerob kultiviert. Hierzu wurde das Medium ohne Vitamin- und Spurenelementlösung, C-Quellen und Reduktionsmittel aerob in Kulturflaschen (Müller+Krempel AG, Bülach (Schweiz)) autoklaviert. Bei einer Temperatur von ca. 50°C wurden jeweils die Vitamin- und Spurenelementlösung zugegeben und mit einem Naturgummistopfen luftdicht verschlossen. Im Anschluss daran wurde das warme Medium ca. 20 min über einen sterilen 0,22 µm-Filter mit N<sub>2</sub> begast, um noch gelösten Sauerstoff zu entfernen. Danach wurde dem Medium Reduktionsmittel zugegeben, um eventuell noch vorhandenen Restsauerstoff zu entfernen. Bei einer Anzucht in größeren Volumina, wurde *C. ljungdahlii* in 1 L- bzw. 0,5 L-Kulturflaschen mit Schraubdeckeln und Naturgummistopfen kultiviert, bei kleineren Volumina wurde das Medium mit Hilfe von sterilen Spritzen in zuvor mit N<sub>2</sub> begasteten Hungate-Röhrchen oder 110 mL-Serumflaschen überführt. Kurz vor Gebrauch wurde die entsprechende C-Quelle zugegeben. Bei autotropher Kultivierung mit

H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> wurden zuerst 1 L-Kulturflaschen mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> begast, 120 mL Medium in die Flaschen gefüllt und anschließend mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ein leichter Überdruck (ca. 1 bar) angelegt.

*C. ljungdahlii* wurde üblicherweise in ATCC-Medium 1754 (PETC-Medium) oder MRCM (modifiziertem Reinforced Clostridial Medium) angezogen.

<b>ATCC-Medium 1754 (PETC-Medium)</b>	
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KHPO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	20 mg
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Hefeextrakt	1 g
Spurenelementlösung (10x)	1 mL
Wolfe's Vitaminlösung (10x)	1 mL
Reduktionslösung 1	5 mL
Reduktionslösung 2	5 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
pH mit HCl <sub>konz</sub> auf 5,9 einstellen	
Die Spurenelementlösung und Wolfe's Vitaminlösung wurden nach dem Autolavieren, die Reduktionslösungen erst nach dem Begasen mit N <sub>2</sub> zugegeben.	

<b>MCRM („modified Clostridial Reinforced Medium“) (Cotter <i>et al.</i>, 2009a)</b>	
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KHPO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	20 mg
Pepton	10 g
Fleischextrakt	10 g
Hefeextrakt	3 g
Spurenelementlösung (10x)	1 mL
Wolfe's Vitaminlösung (10x)	1 mL
Reduktionslösung 1	5 mL
Reduktionslösung 2	5 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
pH mit HCl <sub>konz</sub> auf 5,9 einstellen	
Die Spurenelementlösung und Wolfe's Vitaminlösung wurden nach dem Autolavieren, die Reduktionslösungen erst nach dem Begasen mit N <sub>2</sub> zugegeben.	

## Material und Methoden

---

Die C-Quelle wurde separat sterilfiltriert und kurz vor Gebrauch zum Medium zugegeben. Standardmäßig wurde Fruktose in der täglichen Arbeit als C-Quelle benützt, da der Organismus darauf schnell wächst, zur Stammerhaltung und Experimenten zu autotrophen Wachstum wurde *C. ljungdahlii* mit Gas (50 % H<sub>2</sub>/50 % CO<sub>2</sub> (v/v)) kultiviert.

Für einige Versuche zur Natriumabhängigkeit oder bezüglich des Stickstoffmetabolismus wurden Bestandteile des Basismediums ausgetauscht.

---

<b>Medium mit Nitrat als N-Quelle</b>	
KNO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,9 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KHPO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	20 mg
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Hefeextrakt	1 g
Spurenelementlösung (10x)	1 mL
Wolfe's Vitaminlösung (10x)	1 mL
Reduktionslösung 1	5 mL
Reduktionslösung 2	5 mL
H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1000 mL
pH mit HCl <sub>konz</sub> auf 5,9 einstellen	

---

Die Spurenelementlösung und Wolfe's Vitaminlösung wurden nach dem Autolavieren, die Reduktionslösungen erst nach dem Begasen mit N<sub>2</sub> zugegeben.

<b>Medium mit Harnsäure als N-Quelle</b>	
Harnsäure	3 g
KOH	0,67 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,8 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,91 g
KHPO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	20 mg
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Hefeextrakt	1 g
Spurenelementlösung (10x)	1 mL
Wolfe's Vitaminlösung (10x)	1 mL
Reduktionslösung 1	5 mL
Reduktionslösung 2	5 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
pH auf 7,0 einstellen	

zuerst KOH und Harnsäure in Wasser lösen und erhitzen, bis die Harnsäure gelöst ist, anschließend restliche Substanzen lösen und pH auf 7,0 einstellen und autoklavieren  
Die Spurenelementlösung und Wolfe's Vitaminlösung wurden nach dem Autoklavieren, die Reduktionslösungen erst nach Begasen mit N<sub>2</sub> zugegeben.

<b>PETC-Spurenelementlösung (10x) (Tanner <i>et al.</i>, 1993)</b>	
Nitrilotriessigsäure (pH 6)	20 g
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	10 g
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 12 H <sub>2</sub> O	8 g
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	2 g
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	2 mg
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	0,2 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

Zuerst die Nitriloessigsäure mit KOH auf pH 6,0 einstellen, danach den Rest lösen.  
Lösung sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren.

---

**Wolfe's Vitaminlösung (10x) (Wolin *et al.*, 1963)**

---

Biotin (Vitamin H)	20 mg
Folsäure (Vitamin B <sub>9</sub> )	20 mg
Pyridoxin-HCL (Vitamin B <sub>6</sub> )	100 mg
Thiamin-HCl (Vitamin B <sub>1</sub> )	50 mg
Riboflavin (Vitamin B <sub>2</sub> )	50 mg
Nicotinsäureamid (Vitamin PP)	50 mg
D-Ca-Pantothenat (Vitamin B <sub>5</sub> )	50 mg
Cyanocobalamin (Vitamin B <sub>12</sub> )	1 mg
p-Aminobenzoesäure (Vitamin B <sub>10</sub> )	50 mg
Liponsäure	50 mg
H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1000 mL

---

Lösung sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren.

---

**Reduktionslösung 1: Cystein/HCl-Stammlösung**

---

L-Cystein/HCl*H <sub>2</sub> O	4 g
H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 100 mL

---

Die Reduktionslösung wurde sterilfiltriert und anaerobisiert.

---

**Reduktionslösung 2: Na<sub>2</sub>S + Cystein/HCl-Stammlösung**

---

NaOH	0,9 g
Na <sub>2</sub> S*9H <sub>2</sub> O	4 g
L-Cystein/HCl*H <sub>2</sub> O	4 g
H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 100 mL

---

Zuerst wurde das NaOH gelöst, anschließend darin Cystein/HCl und Na<sub>2</sub>S. Die gesamte Lösung wurde sterilfiltriert und anaerobisiert.

### 2.4.1.4. Agarshakes/Hohe Schicht

Da *C. ljungdahlii* nicht auf Agarplatten gewachsen ist, wurde der Organismus in Agar-Shakes vereinzelt. Hierbei wurden 3,3 g Agar „Bacteriological No. 1“ eingewogen und in ca. 300 mL Millipore Wasser suspendiert, 15-20 min gerührt und anschließend, nach der Sedimentation des Agars, wurde der Überstand vorsichtig abgegossen. Dieser Waschvorgang wurde 5x wiederholt und nach dem letzten Waschschrift wurde der Agar in 100 mL Millipore Wasser aufgenommen. Der Agar wurde in einer Mikrowelle aufgeschmolzen und unter Rühren in

einem warmen Wasserbad zu je 3 mL Portionen in Reagenzgläser verteilt. Die Reagenzgläser wurden mit Alu-Kappen verschlossen und autoklaviert.

Um *C. ljungdahlii* vereinzeln zu können, wurden 5-6 Röhrchen mit Agar in einem siedenden Wasserbad erhitzt, bis der Agar komplett geschmolzen war. Anschließend wurde das Wasserbad langsam heruntergekühlt. Bei ca. 70°C wurden 6 mL anaerobes Medium und 100 µL Fruktose (50% w/v) vorsichtig zugegeben. Das Gemisch wurde weiter heruntergekühlt und bei einer Temperatur von knapp unter 50°C 50 µL Reduktionslösung 1 und wenn nötig Antibiotika zupipetiert. Das erste Agarröhrchen wurde mit 50-200 µL gewachsener Kultur angeimpft, mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen und einmal vorsichtig umgeschwenkt, um den Inhalt zu vermischen. Anschließend wurde ein Tropfen in das nächste Röhrchen gegeben, vermischt, usw. bis die Verdünnungsreihe mit dem letzten Röhrchen komplett war. Die fertigen Röhrchen wurden zum Erstarren in ein Eiswasserbad gestellt und anschließend mit N<sub>2</sub> begast und luftdicht mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen. Damit kein Kondenswasser auf den Agar tropft, wurden die Agarshakes umgedreht inkubiert.

#### 2.4.2. Medienzusätze

Antibiotika wurden sterilfiltriert und dem Festmedium nach Abkühlen auf unter 50°C zugefügt, Flüssigmedien wurden die Antibiotika direkt vor Gebrauch zugegeben. IPTG und X-Gal wurden ca. 30 min vor Gebrauch auf den Agarplatten gleichmäßig verteilt, damit die verwendeten Lösungsmittel verdampfen konnten. Wurden die Zusätze in Ethanol oder Dimethylformamid gelöst, wurde auf eine Sterilfiltration verzichtet. Die Stamm- und Arbeitskonzentrationen der Medienzusätze sind aus Tab. 3 zu entnehmen.

**Tab. 3: Mediumszusätze**

Mediumszusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL (H <sub>2</sub> O)	100 µg/mL
Tetracyclin	30 mg/mL (70 % EtOH)	15 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL (H <sub>2</sub> O)	50 µg/mL
Chloramphenicol	50 mg/mL (70 % EtOH)	25 µg/mL
Polymyxin B	40 mg/mL (H <sub>2</sub> O)	20 µg/mL
Erythromycin	5 mg/mL (70 % EtOH)	5 µg/mL
Thiamphenicol	20 mg/mL (DMF)	7,5 µg/mL
Chlarithromycin	1 mg/mL (70 % EtOH)	1 µg/mL
IPTG	100 mg/mL (H <sub>2</sub> O)	50 µg/mL
X-Gal	8 % in DMF	0,008 %

### 2.4.3. Anzuchtbedingungen

Aerobes Wachstum erfolgte bis zu einem Volumen von 5 mL in Reagenzgläsern, bei größeren Volumina in Erlenmeyerkolben auf einem Inkubationsschüttler bei 150 – 180 rpm bei einer Temperatur von 37°C. Das Wachstum auf Festmedien erfolgte auf Agarplatten ebenfalls bei 37°C.

*C. ljungdahlii* wurde anaerob bei 37°C kultiviert. Bis zu einem Volumen von 10 mL wurden Anaerobentröhrchen mit Butyl-Septen und Schraubdeckeln, bei Volumina von 10 mL bis 50 mL wurden Serumflaschen mit Butylstopfen und Alu-Bördelkappen verwendet. Bei Kulturvolumina von mehr als 50 mL wurde *C. ljungdahlii* in Kulturflaschen mit Naturgummistopfen und Edelstahldeckeln angezogen (Anaerobenzubehör von Ochs GmbH, Bovenden bzw. Brennstein Laborbedarf, Markt Schwaben).

### 2.4.4. Stammhaltung

Für die kurzfristige Stammhaltung von *E. coli*, *B. subtilis* und *S. aureus* wurden diese Stämme auf LB-Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend für 3-4 Wochen im Kühlschrank gelagert. Um Austrocknung und Kontaminationen zu vermeiden wurden die Platten mit Parafilm verschlossen. *C. ljungdahlii* wurde zur Stammhaltung autotroph in Kulturflaschen bei 37°C angezogen und alle 2-3 Wochen in frisches Medium transferriert.

Um Stämme langfristig zu lagern, wurden 700 µL frisch gewachsener Kultur mit 500 µL 100% Glycerin gemischt und anschließend bei -70°C gelagert. Für Glycerinkulturen von *C. ljungdahlii* wurde im Anaerobenzelt gearbeitet, da die Zellen sehr sensitiv auf Sauerstoff reagieren.

### 2.4.5. Reinheitskontrolle

Von Flüssigkulturen wurden regelmäßig Reinigungsausstriche auf entsprechenden Agarplatten angelegt bzw. Verdünnungsreihen in Agarshakes im Falle von *C. ljungdahlii*. Außerdem wurden Proben in einem Phasenkontrastmikroskop untersucht und dabei auf abweichende Eigenschaften in der Kolonie- und Zellmorphologie geachtet. Des Weiteren



wurde genomische DNA aus Kulturen isoliert und mit *C. ljungdahlii*- und *C. acetobutylicum*-spezifischen Primern auf Kontaminationen durch *C. acetobutylicum* getestet.

#### 2.4.6. Bestimmung der optischen Dichte

Der Wachstumsverlauf der Kulturen wurde über die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) verfolgt. Dafür wurde ein UV/VIS-Spektrometer verwendet. Als Referenz diente das entsprechende unbewachsene Medium. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die Proben ab einem Wert von 0,4 verdünnt.

### 2.5. Techniken für das Arbeiten mit DNA

#### 2.5.1. Geräte und Lösungen

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle thermostabilen Lösungen, Glaswaren und andere Materialien, die für das Arbeiten mit Nukleinsäuren notwendig waren, durch Autoklavieren (20 min bei 121°C) sterilisiert oder ggf. abgeflammt. Hitzelabile Substanzen (z. B. Antibiotika, Lysozym) wurden steril filtriert. Des Weiteren wurde der Arbeitsplatz regelmäßig mit 70%igem Ethanol (v/v) gereinigt.

#### 2.5.2. Isolierung chromosomaler DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus *C. ljungdahlii* wurde das Master Pure DNA Purification Kit (Fa. Epicentre, Madison, USA). Hierfür wurden 2 mL einer gut gewachsenen Kultur verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe von Proteinase K (60 mg/mL) bei 65°C lysiert. Nach der Lyse wurde die enthaltene RNA durch Zugabe von RNase A (100 mg/mL) bei 37°C abgebaut. Im Anschluß wurde die DNA durch eine Isopropanol-Fällung präzipitiert (2.5.4)

### 2.5.3. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Zur Denaturierung der Proteine wurde 1 Vol. Phenol-Lösung zugegeben und die Phasen kräftig gemischt. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (10000 rpm, 10 min) um die Phasen zu trennen. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr zu erkennen war. Die Entfernung des Phenols erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. Chloroform und erneuter Zentrifugation.

Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA darin anschließend mit Isopropanol gefällt (2.5.4)

### 2.5.4. DNA-Fällung mit Isopropanol

Zur Fällung der Nukleinsäurelösung wurde die wässrige DNA-Lösung mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetatlösung (pH 5,5) und 2,5 Vol. Isopropanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (10000 rpm, 10 min, RT). Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10000 rpm, 10 min, RT). Nach Abnahme des Überstandes wurde das verbleibende DNA-Pellet ca. 10 bis 15 min an der Luft getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.5.5. Isolierung von Plasmid DNA

Zur Isolierung von Plasmid DNA wurde das AxyPrep<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit verwendet. Das Plasmidisolierungskit basiert auf der alkalischen Lyse verbunden mit der Verwendung einer Säule mit einer Silikat-Gel-Membran, an welche Plasmid-DNA während der Aufreinigung selektiv bindet. Proteine und andere zelluläre Verunreinigungen können nicht binden und werden somit abgetrennt. Bereits während der Lyse erfolgte eine RNase-Behandlung wodurch die gewonnene DNA darüber hinaus frei von RNA war.

Die Durchführung der Plasmid-Isolierung erfolgte gemäß der vom Hersteller mitgelieferten Versuchsanleitung.

### 2.5.6. Aufreinigung von PCR-Produkten

Um überschüssige Nukleotide, Primer, Puffer und Enzymreste, die nachfolgende Reaktionen stören können, zu entfernen, wurden die DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen oder Enzymverdau aufgereinigt. Dazu wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System verwendet. Die Aufreinigung wurde analog zum Protokoll durchgeführt mit der Abweichung, dass die Elution der DNA-Fragmente mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> erfolgte.

### 2.5.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Auch für die Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System verwendet. Bei unspezifischen PCR-Produkten oder mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA wurden nach Auftrennung im Agarosegel die gewünschten Fragmente mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Entfernung von Gelrückständen und die Aufreinigung der DNA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.5.8. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Molekülgröße. Negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente von mehreren Faktoren abhängt, wie z.B. der Größe der Gelporen (bestimmt durch die Agarosekonzentration), der angelegten Spannung und der Salzkonzentration des Puffers. Es erfolgt eine Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe, da deren Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrer Molekularmasse ist. Als Färbemittel diente Ethidiumbromid, welches an dsDNA bindet. Die als Banden erscheinenden DNA-Fragmente wurden im UV-Licht sichtbar gemacht, fotografisch festgehalten, und analysiert. Der Vergleich mit einem Standard erlaubte sowohl eine Größen-, als auch eine Mengenabschätzung der aufgetragenen DNA-Fragmente.

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Agarose-Konzentration von 0,8 % oder 2 % gewählt. Die Agarose wurde in 1x TAE unter kurzem Aufkochen in der Mikrowelle gelöst bis eine klare homogene Lösung entstand. Diese Lösung wurde mit einer Temperatur von etwa 50°C in einen abgegrenzten Bereich (100 x 70 x 0,5 mm) einer Gellaufkammer

## Material und Methoden

---

gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurde dieses mit TAE-Puffer bedeckt und der Kamm entfernt. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die DNA-Proben 5:1 mit Loading-Dye versetzt, der einerseits zur Beschwerung der Proben, andererseits zur Markierung der Lauffront bei 500 bp diente. Zur späteren Auswertung und Größenbestimmung wurde zusätzlich ein DNA-Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Für die Auftrennung der DNA-Proben im Gel wurde eine konstante Spannung von 100 bis 120 V angelegt und für 30 bis 45 min beibehalten, bis die Lauffront ca. 1,5 cm vom unteren Rand des Gels entfernt war. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel für ca. 10 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und das Gel anschließend in einem Wasserbad für 5 – 10 min entfärbt. In einer Gel-Dokumentationsanlage (Alpha Imager Mini) wurde die DNA bei UV-Licht durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

Zur Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente sowie der Menge der DNA wurde eine 1 kb-Leiter (GeneRuler 1 kb ladder, MBI Fermentas) mit einem Größenstandard von 0,25-10 kb benutzt. Zur genaueren Größenbestimmung kleiner Fragmente wurde eine 100 bp-Leiter (GeneRuler 100 bp ladder, MBI Fermentas) mit einem Größenstandard von 0,1-1 kb verwendet.

### Ethidiumbromid-Färbebad:

100 µL einer 10 mg/mL Ethidiumbromidlösung wurden in 100 mL H<sub>2</sub>O gegeben.

### 50 x TAE-Puffer, pH 8,0

Tris	242	g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100	mL
Eisessig	57	mL
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	<i>ad</i> 1000	mL

### Loading-Dye:

Bromphenolblau	0,125	g
Xylencyanol	0,125	g
Ficoll 400	7,5	g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	<i>ad</i> 50	mL

28

### 2.5.9. Eckhardt-Lyse

Die Eckhardt-Lyse (Eckhardt, 1978) ist eine schnelle Methode zum Nachweis von Plasmid-DNA aus Kolonien auf Festmedium und lässt Rückschlüsse auf die Anzahl der Plasmide und die Plasmidgröße zu. Bei dieser Methode werden die Lyse der Zellen, die Isolierung, Reinigung sowie elektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNA im Gel direkt miteinander kombiniert. Sie hat den Vorteil, dass die Kultivierung der einzelnen Klone in Flüssigmedium entfällt und somit viele Kolonien in kurzer Zeit untersucht werden können. Die Eckhardt-Lyse konnte verwendet werden, um rekombinante Plasmide von Leervektoren zu unterscheiden, solange die Plasmide einen gewissen Größenunterschied besaßen. Dafür wurde jeweils als Referenz ein *E. coli*-Stamm mit dem nicht rekombinanten Plasmid verwendet. Plasmide mit dem gewünschten Insert wiesen ein abweichendes Bandenmuster als die Referenzprobe auf.

Zur Herstellung des Gels wurden 100 mL einer 0,8 %ige (w/v) Agaroselösung in 1x TAE-Puffer hergestellt. Nach dem Abkühlen der noch flüssigen Agaroselösung auf ca. 60°C erfolgte die Zugabe von 1 mL 10 %igem (w/v) SDS. Nachdem damit ein Gel in einer Harnischmacher Kammer gegossen wurde, wurde das Gel nach dem Erstarren mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde wenig Zellmasse von einer Kolonie abgenommen und in 20 µL E1-Lösung, die mit 5 mg/mL Lysozym und 0,5 mg/mL RNase A versetzt war, schnell und vollständig suspendiert. Die so behandelten Proben wurden sofort in die Taschen des vorbereiteten Agarosegels pipetiert, 5 min inkubiert und der Vorlauf (20 V für 30-40 min, bis zum Aufklaren der Taschen) gestartet. Dabei bewirkt das SDS im Gel die Zellyse, wodurch es zur Freisetzung der DNA kommt. Die Plasmid-DNA wandert in das Gel, die verunreinigenden Zellrückstände sowie der überwiegende Teil der chromosomalen DNA bleibt in den Geltaschen zurück. Anschließend erfolgte während des Hauptlaufes (120 V für 90-120 min) die Auftrennung der Plasmide. Zur Entfernung des SDS wurde das Gel unter schwenken 4 x 30 min gewässert. Im Anschluss daran wurde das Gel für 20 min im Ethidiumbromidbad gefärbt und ca. 20 min in einem Wasserbad teilweise entfärbt. Die Detektion der angefärbten DNA erfolgte im UV-Licht in der Gel-Dokumentationsanlage.

#### E1-Lösung:

Saccharose                    25 % (w/v)

Ficoll 400                    10 % (w/v)

Lösung sterilfiltrieren

### 2.6. Techniken für das Arbeiten mit RNA

#### 2.6.1. Geräte und Lösungen

Das Arbeiten mit RNA erfordert äußerst sauberes Arbeiten, um eine Kontamination mit den sehr stabilen RNasen zu vermeiden. Demzufolge wurden alle thermostabilen Lösungen, Glaswaren, Pipettenspitzen und andere Materialien, die für das Arbeiten mit RNA notwendig waren, 2x bei 120°C für 20 min autoklaviert. Die Arbeiten wurden ausschließlich mit Handschuhen durchgeführt. Der Arbeitsplatz und sämtliche notwendigen Geräte wie z. B. Pipetten wurden wiederholt mit 70%igem (v/v) Ethanol gesäubert.

#### 2.6.2. Zellaufschluss von *C. ljungdahlii*-Zellen mit der Zelmühle

Für die Isolierung von RNA aus *C. ljungdahlii* Zellen ist der Zellaufschluss durch Lysozym ungeeignet, da allein die Inkubationszeiten und-temperaturen einen vorzeitigen Abbau der RNA zur Folge hätten. Daher wurden die Zellen bei sehr tiefen Temperaturen mit der Zelmühle aufgeschlossen, wodurch der Abbau von RNA vermieden wird.

Bei der Zelmühle handelt es sich um einen Dismembrator, in welchem eine Chromstahlkugel mit einer hohen Geschwindigkeit in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten PTFE-Zylinder hin und her geschlagen wird. Auf diese Weise werden im Zylinder befindlichen Proben (Zellen) zu einem feinen Pulver zermahlen.

Um RNA aus *C. ljungdahlii* Zellen zu isolieren, wurden Zellen der exponentiellen Phase aus dem Kulturgefäß mit einer Spritze entnommen, sofort mit 0,2 Vol. eiskaltem Methanol versetzt und bei -20°C geerntet (7000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder bei -70°C gelagert oder sofort damit weitergearbeitet. Dazu wurde das Pellet mit 2 mL sterilem TE-Puffer gewaschen, um restliches Methanol zu entfernen und danach in 200 µL sterilem TE-Puffer gelöst. Parallel wurden das Teflongefäß und die Stahlkugel in flüssigen Stickstoff gekühlt. Die resuspendierten Zellen wurden nun in den Teflonzylinder mit der Metallkugel und etwas verbleibenden Stickstoff getropft, das Gefäß verschlossen und in die Zelmühle eingespannt. Der Aufschluss erfolgte bei 1600 rpm für 3 min. Beim Öffnen enthielt das Gefäß ein weißliches gekühltes Zellpulver. Die aufgeschlossenen Zellen wurden vorsichtig in 4 mL RLT-Puffer des RNeasyMidi Kits, welchem zuvor 40 µL Mercaptoethanol zugesetzt wurden resuspendiert. Der RLT-Puffer enthält eine hohe Konzentration an Guanidiniumhydrochlorid, welches stark denaturierend auf Proteine wirkt und somit RNasen

inaktiviert. Dadurch konnten die gelösten Zellbestandteile bei Bedarf im RLT-Puffer bei 4°C über Nacht bis zur RNA-Präparation aufbewahrt werden.

TE-Puffer, pH 8,0

Tris/HCl	10	mM
EDTA	1	mM

### 2.6.3. Isolierung von RNA

Die Isolierung und Reinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Midi Kits nach Anleitung des Herstellers. Für die Elution der RNA wurden 2 x 150 µL RNase freies und steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eingesetzt und die RNA bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.6.4. DNase Verdau und Qualitätskontrolle der RNA

Um Verunreinigungen der RNA mit Resten chromosomaler DNA zu vermeiden, wurde die RNA Lösung einer DNase Behandlung unterzogen.

Zu den ca. 300 µL wässriger RNA Lösung aus der RNA Isolation (2.6.3), wurden 85 µL 5x DNase Puffer und 15 µL DNase I (10 U/µL) gegeben. Während einer Inkubation des Ansatzes für 2-3 h bei 25°C wurde verbliebene DNA durch die DNase degradiert. Die DNase wurde durch eine anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt.

DNase Puffer 5x

MgSO <sub>4</sub>	25	mM
NaAcetat, pH 5,0	0,5	M
2 x autoklaviert		

### 2.6.5. Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung der RNA

Zur Entfernung von unerwünschten Proteinkontaminationen wurde der Ansatz nochmals durch eine Extraktion mit Phenol/Chloroform aufgereinigt.

Die Extraktion von RNA erfolgte unter Zugabe von 1 Vol. saurem Phenol. Der Ansatz wurde geschüttelt, so dass sich die wässrige und die Phenol-Phase vermischen. Bei der anschließenden 10 minütigen Zentrifugation bei 11000 rpm erfolgte eine Phasentrennung, bei der die obere, wässrige Phase die gelöste RNA enthielt, die denaturierten Proteine sich hingegen in der Interphase befanden. Die obere Phase wurde, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA enthaltende, obere Phase wurde anschließend mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, ebenfalls geschüttelt und 10 min bei 11000 rpm zentrifugiert und die entstandene obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch das Chloroform wird das Phenol aus der wässrigen Phase gezogen.

Um die RNA zu Fällern wurde die wässrige Phase mit 0,1 Vol. 3,3 M NaAcetat (pH 5,5) und 2,5 Vol. -20°C kaltem Isopropanol versetzt und gemischt. Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht. Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 min bei 13000 rpm und -10°C wurde das Isopropanol vorsichtig mit der Pipette abgenommen, ohne das RNA Pellet zu verletzen. Mit 1 mL 70%igem Ethanol wurde das Pellet gewaschen, 30 min bei 13000 rpm und -10°C zentrifugiert und der Ethanol vorsichtig möglichst vollständig abgenommen. Das Reaktionsgefäß mit dem RNA Pellet wurde offen in einem mit Alufolie verschlossenem, RNase freiem Becherglas bei 37°C für ca. 15 min getrocknet, bis alle Ethanolspuren verdampft waren. Gelöst wurde das Pellet, je nach Größe, in 10 – 40 µL RNase freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> für 1-2 h auf Eis, wobei es gelegentlich vorsichtig durch Schnipsen gegen das Reaktionsgefäß gemischt wurde. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Um sicher zu gehen, dass sämtliche DNA abgebaut wurde, erfolgte eine PCR (2.8.1) mit spezifischen Primern, um ein ca. 500 bp großes Fragment zu amplifizieren. Chromosomale DNA wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die PCR-Ansätze wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei lediglich bei der Positivkontrolle ein Amplifikationsprodukt erscheinen durfte. Andernfalls musste nochmals ein DNase Verdau mit der Turbo DNase durchgeführt werden.

Um die Qualität der RNA zu überprüfen, wurde mit der RNA eine RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt und dabei ein ca. 1,5 kb großes Fragment amplifiziert.

Die Konzentration der RNA wurde mit einem NanoDrop-Messgerät bei einer 1:10-Verdünnung durchgeführt.



## 2.7. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

### 2.7.1. Restriktion

Die Sequenz-spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde zu analytischen und präparativen Zwecken durchgeführt.

Der Verdau erfolgte in den von den Herstellern der Restriktionsenzyme mitgelieferten Puffersystemen bei den empfohlenen Temperaturen. Bei Restriktionsansätzen mit mehreren Enzymen wurde darauf geachtet, dass alle Enzyme in dem gemeinsamen Puffer eine Aktivität von mindestens 50-100 % hatten. War eine Inkubation mit mehreren Enzymen gleichzeitig nicht möglich, wurden einzelne Restriktionsverdaus durchgeführt und die einfach geschnittene DNA dazwischen gereinigt (2.5.6). Die optimalen Bedingungen und Puffer für Restriktionsverdaue mit zwei Enzymen konnten auch auf der Internetseite des Enzymherstellers abgefragt werden ([http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest/?country\\_code=DE](http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest/?country_code=DE)).

Weiterhin war zu beachten, dass bei einigen Restriktionsendonukleasen eine Konzentration von über 5 % (v/v) Glycerin eine sogenannte „Star-Aktivität“ zu beobachten ist. Dabei werden auch ähnliche Erkennungssequenzen geschnitten, so dass es zu einer unspezifischen Restriktion der DNA kommt (Nasri & Thomas, 1986). Da die Lagerungspuffer der Enzyme ca. 50 % (v/v) Glycerin enthalten, wurde den Ansätzen höchstens 0,1 Vol Enzym zugesetzt.

Die Überprüfung der Restriktion fand mit Hilfe von nicht-denaturierender Agarose-Gelelektrophorese (2.5.8) statt.

### 2.7.2. Dephosphorylierung

Um eine Re-Ligation restriktionsverdauter Vektoren zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphat-Gruppen der linearisierten Vektoren mit einer Alkalischen Phosphatase abgespalten. Die Dephosphorylierung wurde meist direkt im Verdauansatz durchgeführt, da die verwendete Phosphatase mit den Restriktionspuffersystemen der gleichen Firma kompatibel ist und eine hohe Aktivität besaß. Es wurden 10 U Enzym/ $\mu\text{g}$  DNA zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde das Enzym für 20 min bei 65°C inaktiviert.

### 2.7.3. Generierung von *blunt ends*

Da es manchmal nötig war, DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Überhängen zu ligieren, wurden die Enden zuvor geglättet. Dies geschah mit einer T4-DNA-Polymerase, die 5'-Überhänge auffüllt und 3'-Überhänge durch seine 3'-Exonuclease-Aktivität abschneidet (Sambrook, 2001). Der folgende Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

<b>Reaktionsansatz für die Generierung von <i>blunt ends</i></b>	
DNA	1 µg
5x Reaktionspuffer	4 µL
dNTP (10mM)	1 µL
T4 DNA Polymerase (5U/µL)	1 µL
H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 20 µL

Anschließend wurde der Ansatz mit dem Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt.

### 2.7.4. Ligation

DNA-Ligasen knüpfen unter Verbrauch von ATP Phosphodiesterbindungen zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxyl-Gruppe bei doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Vektor- und Insert-DNA wurde in variablen Mengenverhältnissen eingesetzt, wobei immer ein deutlicher Überschuss an Insert-DNA verwendet wurde. Die Ligation wurde mit einer T4-Ligase nach Angaben des Herstellers pipetiert, hochgerechnet auf ein Volumen von 30 µL. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

### 2.7.5. Klonierung durch Hybridisierung

Mit der Hybridisierung konnte punktgenau und ohne die Generierung von neuen Restriktionsschnittstellen bzw. Verwendung von Restriktionsenzymen kloniert werden. Diese Methode der Klonierung wurde v. a. dann verwendet, wenn kleine Fragmente punktgenau oder mehrere Fragmente in einen Vektor kloniert werden mussten und es deshalb schwierig war, Restriktionsschnittstellen zu finden. Es mussten hierfür insgesamt vier DNA-Fragmente erzeugt werden, die jeweils an einem Ende einen 12-14 bp-langen Überhang hatten, der zu jeweils einem Überhang eines anderen Fragmentes komplementär war. Dadurch entstanden jeweils zwei Sorten von Insert- und Vektorfragmenten, die gegenseitig miteinander hybridisieren konnten (siehe Abb. 4).

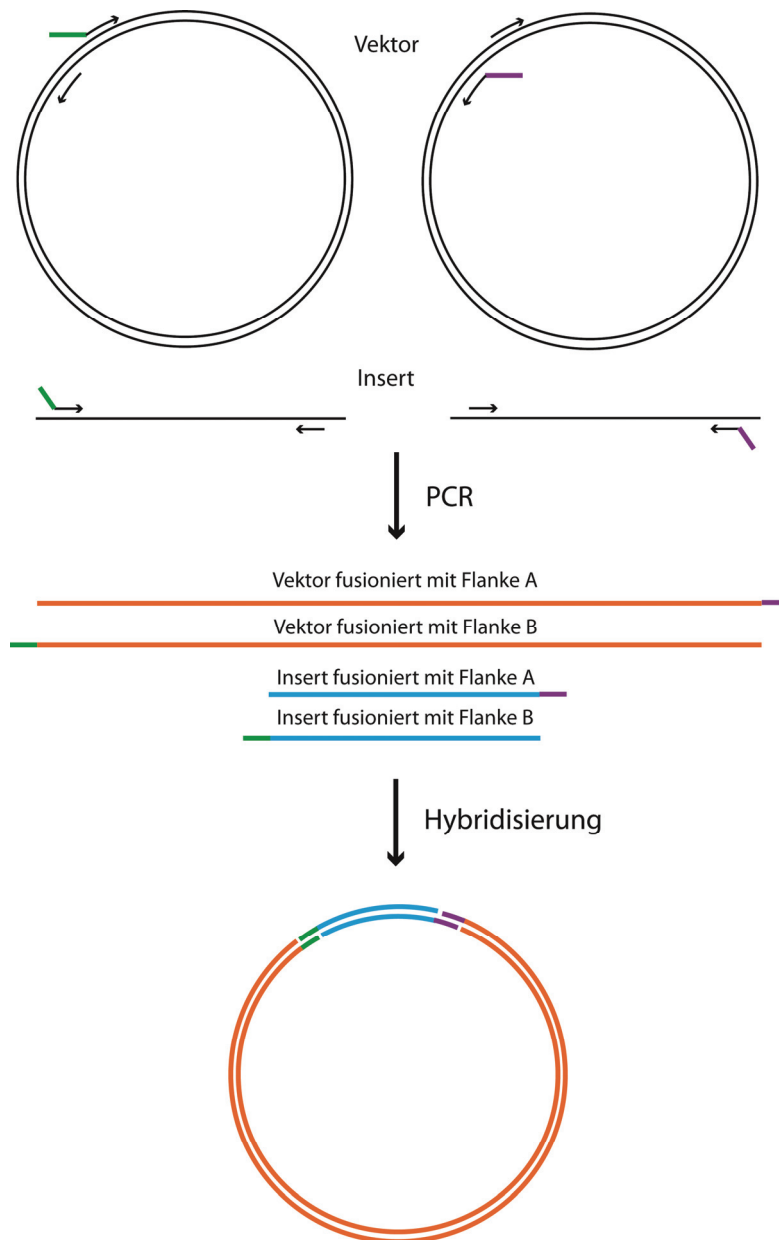


Abb. 4: Schema zur Hybridisierung von neuen Vektoren für *C. ljungdahlii*

Nachfolgender Hybridisierungsansatz wurde hierfür verwendet.

Hybridisierungsansatz	
Vektor PCR1	20 ng DNA / kb
Vektor PCR2	20 ng DNA / kb
Insert PCR1	20 ng DNA / kb
Insert PCR2	20 ng DNA / kb
Tris/HCl pH8,5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM
H <sub>2</sub> O	ad 25 µL

Die Hybridisierung erfolgte im Thermocycler unter Verwendung des folgenden Programms:

Hybridisierungsprogramm:

Denaturierung	94°C	3 min	
Zyklen		4	
Denaturierung	65°C	2 min	
Anlagerung ( <i>annealing</i> )	50°C	30 s	ramp: 0,5°C/s
Elongation	39°C	10 min	ramp: 0,5°C/s

Im Anschluss wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* transformiert (siehe 2.10.1.1). Die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum.

## 2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die *in vitro*-Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten und stellt eine zentrale Methode des molekulargenetischen Arbeitens dar. Für die PCR sind ein Oligonukleotidpaar, Matrizen-DNA (Template) sowie eine thermostabile DNA-Polymerase notwendig.

### 2.8.1. ‚Standard‘ PCR

Für die Amplifikation wurde standardmäßig die Phire Hot-Start II DNA-Polymerase verwendet. Wenn die Amplifikate für Klonierungen weiterverwendet wurden, wurde die Phusion DNA Polymerase verwendet, da diese Polymerase über eine proof-reading Funktion verfügt. Der Oligonukleotidprimer hatte im Durchschnitt eine Länge von 16-24 Nukleotiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 47 dargestellt. Für eine optimale Amplifikation sollten die Oligonukleotide eine annähernd gleiche Schmelztemperatur aufweisen. Alle PCR Reaktionen erfolgten in Thermocyclern der Firmen MWG, Eppendorf und Jena Analytik. Im Folgenden sind der Standardreaktionsansatz und das entsprechende PCR Programm dargestellt.

### Standard-PCR-Reaktionsansatz:

Matrizen-DNA	100-500 ng
Primer 1 (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
Primer 2 (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
dNTP-Gemisch (10 mM)	0,4 $\mu$ L
5x Phire Puffer	4 $\mu$ L
Polymerase (Phire DNA-Polymerase)	0,2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 20 $\mu$ L

### Standard-PCR-Programm:

Denaturierung	98°C	2 min
Zyklen		25
Denaturierung	96°C	20 s
Anlagerung ( <i>annealing</i> )	$T_m - 2$	20 s
Elongation	72°C	20 s/kb
Elongation	72°C	5 min

PCR-Amplifikate wurden zunächst mittels analytischer Gelelektrophorese überprüft und bei weiterer Verwendung anschließend aufgereinigt (siehe 2.5.6). Ergab eine PCR-Reaktion mehrere Banden wurde eine präparative Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion durchgeführt (siehe 2.5.7)

### 2.8.2. Reverse Transkription PCR

Bei einer Reversen Transkriptions-PCR wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben, welche anschließend mittels PCR amplifiziert werden kann. Die reverse Transkription und die anschließende PCR konnten mit dem in dieser Arbeit verwendeten QIAGEN<sup>®</sup> OneStep RT-PCR Kit in einem Schritt durchgeführt werden.

25µL Ansatz:

3	µL	5 µM Primer A
3	µL	5 µM Primer B
1	µL	10 mM dNTP-Mix
5	µL	5x OneStep RT-PCR Puffer
1	µL	OneStep RT-PCR Enzymmix
400	ng	RNA
ad 25	µL	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (RNase free)

Programm:

Reverse Transkription	50°C	30 min
Aktivierung der DNA-Polymerase	96°C	15 min
Zyklen		25
Denaturierung	96°C	30 s
Anlagerung ( <i>annealing</i> )	56°C	30 s
Elongation	72°C	2 min
Elongation	72°C	10 min

### 2.8.3. Quantitative *Real-time* PCR

Die quantitative Real-time PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren und damit sehr gut zur Expressionsanalyse einzelner Gene geeignet. Ein entscheidendes Werkzeug der Real-time PCR sind Farbstoffe oder Fluorophore, welche an die DNA binden und über deren Signal die Kinetik der PCR ‚live‘ beobachtet werden kann. Die Markierung der DNA kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: nach dem TaqMan Prinzip, mit *molecular beacons*, *hybridization probes* oder mittels eines Farbstoffes wie SYBR<sup>TM</sup> Green. Der entscheidende Vorteil von SYBR<sup>TM</sup> Green liegt darin, dass dieser Farbstoff unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, wohingegen für die anderen genannten Markierungsmöglichkeiten die Synthese spezifischer Sonden notwendig ist.

Bei der quantitativen Real-time PCR wird über das Fluoreszenzsignal indirekt die Zunahme des PCR Produktes gemessen. Zunächst verläuft die PCR-Produktbildung annähernd linear. Limitierende Faktoren wie z. B. die Abnahme der dNTP-Konzentration, verminderte Enzymaktivität bzw. die Anhäufung von Pyrophosphat verlangsamen jedoch die

Produktbildung in der späten Phase der PCR-Reaktion. Die Quantifizierung bei der Real-time PCR erfolgt über den sogenannten  $C_T$ -Wert (*cycle threshold*). Hierbei handelt es sich um die Zykluszahl, bei welcher sich das Fluoreszenzsignal einer Probe das erste Mal signifikant vom Hintergrund abhebt. Anhand einer Standardkurve können definierten Templatemengen  $C_T$ -Werte zugewiesen werden. Beim Vergleich zweier Versuchsbedingungen hinsichtlich der Expression eines ausgewählten Gens war eine solche Bestimmung der absoluten Menge an *template*-RNA nicht notwendig. Nach folgender Formel kann allein über die  $C_T$ -Werte eines Gens X unter beiden Bedingungen im Vergleich zu den  $C_T$ -Werten eines konstitutiven Gens, ebenfalls unter beiden Bedingungen der Regulationsfaktor ermittelt werden:

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

$$\text{mit } \Delta\Delta C_T \text{ für Gen X} = (C_{T_x} - C_{T_{\text{konstitutiv}}})_{\text{Bedingung I}} - (C_{T_x} - C_{T_{\text{konstitutiv}}})_{\text{Bedingung II}}$$

(Talaat *et al.*, 2002)

Die Primer für jedes Gen wurden mit einer Länge von 20-23bp und einer Schmelztemperatur von ca. 57°C generiert. Die Länge des erwarteten PCR-Produktes sollte bei allen untersuchten ORFs bei etwa 150 bp liegen. Sämtliche Arbeiten waren unter RNase freien Bedingungen durchzuführen. In dieser Arbeit wurde der Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step und das iCycler iQ™ Real-time PCR Detection System der Firma BIO-RAD verwendet. Für den Ansatz der Real-time PCR wurde zuerst ein Mastermix aus dem Brilliant II Master Mix und dem Enzymmix hergestellt, welcher dann auf die zu testenden RNAs aufgeteilt wurde (Premix). Die Primer wurden in 96-well 0,2 mL Thin-Wall PCR Platten vorgelegt und 20 µL Premix zugegeben. Auf diese Weise wurde mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit die gleiche Konzentration aller Reaktionskomponenten in den einzelnen Ansätzen erreicht.



25µL quantitativer Real-time PCR Ansatz:

2,5	µL	5 µM Primer A
2,5	µL	5 µM Primer B
12,5	µL	Brilliant II Mastermix
0,25	µL	Enzymmix
400	ng	RNA
ad 25	µL	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (RNase free)

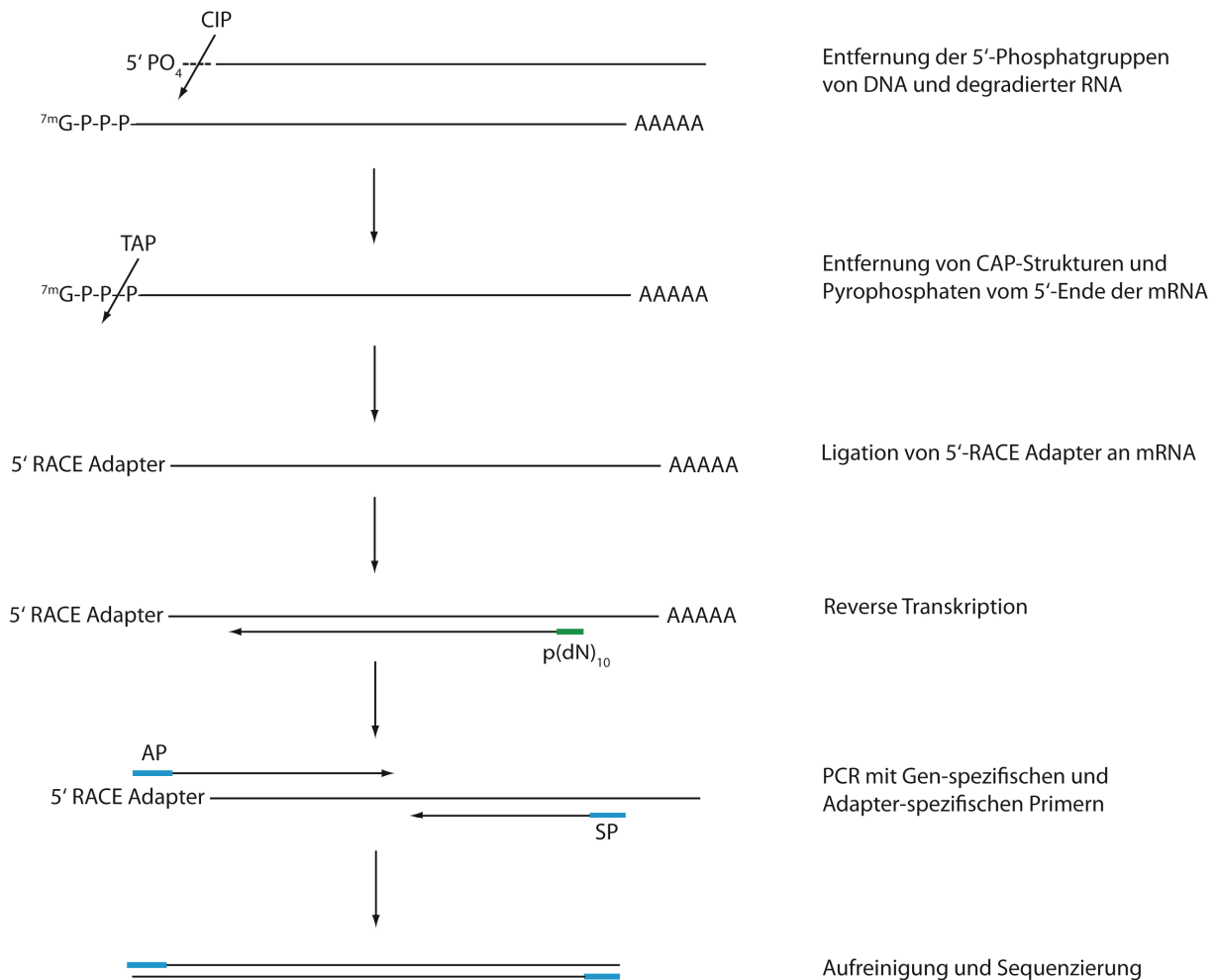
i-Cycler Programm:

Cycle 1:	(1x)			
	Step 1:	50.0°C	30 min	(Reverse Transkription)
Cycle 2:	(1x)			
	Step 1:	95.0°C	10 min	(Aktivierung der DNA-Polymerase)
Cycle 3:	(45x wiederholt)			
	Step 1:	94.0°C	30 s	(PCR)
	Step 2:	53.0°C	1 min	
	Step 3:	72.0°C	30 s	
Cycle 4:	(1x)			
	Step 1:	72.0°C	1 min	(Abschließende Elongation)
Cycle 5:	(80x wiederholt)			
	Step 1:	53.0°C	10 s	(Ermittlung des Schmelzpunktes
		+ 0.5°C		der PCR Produkte)
Cycle 6:	(1x)			
	Step 1:	4.0°C	HOLD	

### 2.9. Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten mittels 5'RLM-RACE

RLM-RACE (*RNA Ligase mediated rapid amplification of cDNA ends*) ist eine PCR-basierte Technik, die in dieser Arbeit verwendet wurde, um Transkriptionsstartpunkte zu bestimmen. Dabei wurde RNA von *C. lujungdahlii* mit Calf Intestine Phosphatase (CIP) behandelt, die die freien Phosphatgruppen am 5'-Ende von degradierter RNA abdaut. Nach Entfernung von CIP durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion werden die Triphosphatgruppen am 5'-Ende von nicht degradierter RNA mittels Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) gespalten. Dadurch entstehen freie Phosphatgruppen, an die mit Hilfe von T4 RNA Ligase ein RNA-Adapter ligiert wird. Anschließend wurde die RNA über eine reverse Transkription mit *random decameres* in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktionen werden mit dem FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion, Huntington/Austin, TX, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (siehe Abb. 5).

Auf der so hergestellten cDNA konnten nun mit jeweils einem Adapter-spezifischen und einem genspezifischen Primer PCR-Produkte amplifiziert werden, die anschließend aufgereinigt (2.5.6) und sequenziert wurden. Bei mehreren PCR-Produkten wurde jede Bande einzeln über Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung (2.5.7) für die Sequenzierung aufbereitet. Bei zu schwachen Banden wurde nochmals eine PCR auf den schon amplifizierten PCR-Produkten mit denselben oder weiter innen liegenden Primern durchgeführt, um die Ausbeute zu erhöhen.



**Abb. 5: Schema der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes eines Gens mittels 5'-RLM RACE.**  
 $P(\text{dN})_{10}$ : Decamere; AP: Adapterspezifischer Primer; SP: Sequenzspezifischer Primer

## 2.10. DNA-Transfer in Bakterien

### 2.10.1. Transformation von *E. coli*

#### 2.10.1.1. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für den Transfer von DNA mittels Hitze-Transformation wurde *E. coli* TOP 10 bzw. *E. coli* S17-1 verwendet. Die Herstellung der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurde modifiziert nach einer Methode nach Lederberg (Lederberg & Cohen, 1974) durchgeführt. Die Transformation erfolgte in modifizierter Form nach Morrison (Morrison, 1977)

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL einer gut gewachsenen über Nacht-Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgte in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7. Die Zellen wurden dann geerntet (5000 rpm, 5 min, 0°C), in 50 mL einer eiskalten CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM) resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen nochmals sedimentiert (5000 rpm, 5 min, 0°C) und in 10 mL der eiskalten CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM) resuspendiert. Nach Zugabe von 2 mL Glycerin (99 %) wurden die Zellen nochmals ca. 5 min auf Eis gestellt und in jeweils 100 µL Aliquots bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurde jeweils ein µL Aliquot kurz auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Beim anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 90 s erfolgte eine Aufnahme der DNA. Nachdem die Zellen kurz auf Eis abgekühlt wurden, wurde 1 mL LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, damit der vektorkodierte Marker exprimiert werden konnte. Anschließend wurden die Zellen auf Agarplatten unter Selektivbedingungen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.10.1.2. Blau-Weiß Screening

Durch Blau-Weiß Screening können rekombinante *E. coli* Klone auf das Vorhandensein des Inserts in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors überprüft werden. Voraussetzung für dieses Selektionsverfahren sind *E. coli* Stämme, die eine aminoternale Deletion im *lacZ*-Gen aufweisen und somit keine funktionstüchtige β-Galactosidase mehr bilden können. Dieser Defekt kann durch einen plasmidkodierte Genort (*lacZ'*), der die verkürzte β-Galactosidase komplementieren kann, ausgeglichen werden, so dass das Enzym wieder funktionsfähig ist und das β-Galactosid X-Gal spalten kann. Dadurch wird ein Farbstoff freigesetzt, der bei Berührung mit Luft oxidiert und die Zellen blau färbt. Da sich bei pUC19, einem in dieser Arbeit verwendeten Vektor, das *lacZ'* in der multiplen Klonierungsstelle befindet, wird bei erfolgreichem Einbau des Inserts das Genfragment unterbrochen und es kann keine aktive β-Galactosidase gebildet werden. Somit kann X-Gal nicht umgesetzt werden und die Kolonien bleiben weiß. Neben X-Gal wird IPTG benötigt, da durch dieses Molekül die Transkription von *lacZ'* induziert wird.

## 2.10.2. Transformation von *C. ljungdahlii*

### 2.10.2.1. Transformation durch Elektroporation

Für *C. ljungdahlii* wurde ein Transformationsprotokoll von Michael Köpke (Köpke, 2009b) bzw. von *C. tyrobutyricum* (Liu *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005) modifiziert. Elektroporationen wurden, wie bei den jeweiligen Experimenten angegeben mit in Tab. 42 angegebenen Parametern durchgeführt.

Die Transformation wurde nach folgendem modifizierten Protokoll durchgeführt. Eine gut gewachsene Kultur von *C. ljungdahlii* wurde benutzt, frisches Transformationsmedium (PETC-Medium mit 40 mM DL-Threonin und Fruktose als C-Quelle) auf eine  $OD_{600} \sim 0,05 - 0,1$  anzuimpfen. Nach Wachstum für 12 - 20 h ( $OD_{600} \sim 0,3-0,7$ ) wurde die Kultur in das Anaerobenzelt eingeschleust und alle nachfolgenden Schritte mit Ausnahme der Zentrifugationen in der sauerstofffreien Atmosphäre des Anaerobenzeltes durchgeführt. Nach der Ernte (7000 g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen mit eiskaltem SMP-Puffer gewaschen (7000 g, 5 min, 4°C) (Tab. 4). Das Sediment wurde anschließend in 0,6 mL eiskaltem SMP-Puffer vorsichtig resuspendiert und in gekühlte Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt, die bereits 0,5 - 2 µg Plasmid-DNA enthielten. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation bei einer Kapazität von 25 µF, einer Spannung von 1,75 kV und einem Widerstand von 800 Ω. Sofort danach wurden die Zellen mit einer Spritze in Hungate-Röhrchen mit 5 mL Medium supplementiert mit Fruktose überführt und bei 37°C zur Regeneration inkubiert. Sobald Wachstum deutlich zu erkennen war (meist am nächsten Tag) wurden Hungate-Röhrchen mit 5 mL-Selektivmedium 10%ig angeimpft und Verdünnungsreihen in Agarshakes, supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, angelegt. Beides wurde bei 37°C inkubiert.

Für die Arbeiten im Anaerobenzelt wurden ausschließlich sterile, gestopfte Spitzen oder sterile Einmalspritzen benutzt, um die Möglichkeit von Kontaminationen mit anderen Clostridien möglichst auszuschließen.

**Tab. 4: SMP-Puffer** (Liu *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005)

<b>SMP-Puffer</b>	
D-(+)-Saccharose	46,2 g
MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,62 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 mL
pH 7,4	

### 2.10.2.2. Konjugation

Parallel zur Transformation wurde versucht, *C. ljungdahlii* mittels Konjugation zu transformieren. Hierbei wurde als Donororganismus *E. coli* bzw. *B. subtilis* getestet.

Hierfür wurden *E. coli* S17-1 mit dem konjugativen Plasmid pKV12 bzw. *B. subtilis* mit den konjugativen Plasmiden pUB110 bzw. pBC16 über Nacht in 5 mL Medium angezogen. Diese Kulturen dienten sowohl zur Konjugation als auch als Vorkultur für eine frische Kultur, die bis zu exponentiellen Wachstum angezogen wurde. Von den exponentiellen und stationären Kulturen wurden 2 mL vorsichtig sedimentiert (3 min, 5000 rpm Haereus Tischzentrifuge) und anschließend mit 1 mL PBS-Puffer (Tab. 5) gewaschen (3 min, 5000 rpm). Gleichzeitig wurden im Anaerobenzelt 2 mL einer ca. 24 h alten Kultur von *C. ljungdahlii* als Rezipient in Reaktionsgefäße gefüllt und ebenfalls vorsichtig pelletiert. Der Überstand von Donor- und Rezipientensedimenten wurde erst im Anaerobenzelt abgekippt und jeweils das Sediment von Donor und Rezipient in 100 µL MCRM-Medium ohne Fruktose gemischt. Diese Mischung wurde im Reaktionsgefäß im Anaerobenzelt für ca. 15 h inkubiert. Anschließend wurde das Konjugationsgemisch in verschiedenen Verdünnungsreihen in Agarshakes mit Antibiotika gegossen und bei 37°C inkubiert. Die Selektion gegen *E. coli* erfolgte mit Polymyxin B, auf das jedoch *C. ljungdahlii* auch sensitiv reagierte. Gegen *B. subtilis* war kein Antibiotikum als Selektion nötig, da der Organismus in den anaeroben Agarshakes kein Wachstum zeigte.

**Tab. 5: PBS-Puffer**

<b>PBS-Puffer</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,23 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,74 g
NaCl	8,77 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 mL
pH 7,4	

## 2.11. Analyse von Kulturüberständen

### 2.11.1. Ionenchromatographie

Kulturüberstände wurden hauptsächlich durch Flüssigkeitschromatographie analysiert. Dazu standen 2 verschiedene Systeme von Dionex zur Verfügung: einerseits ein DX-500 System bestehend aus einer GP40 Gradientenpumpe, einem ED40 elektrochemischen Detektor und einem LC10 Chromatographie Organizer. Das zweite System war ein ICS-3000 Ionenchromatographiesystem mit eingebauten Leitfähigkeits- und elektrochemischen Detektor mit einem angeschlossenen AS40 Autosampler, durch den die Injektion der Proben erfolgte. Beide Systeme wurden mit der Software Chromatographie Management System Chromeleon<sup>®</sup> gesteuert, mit deren Hilfe auch die Auswertung der Chromatogramme erfolgte. Die während dieser Arbeit verwendeten Säulen mit zugehörigen Guard-Säulen stammen ebenfalls von Dionex. Zur Herstellung der Eluenten wurde Milipore-H<sub>2</sub>O (18 MΩ/cm) verwendet, das sterilfiltriert (0,22 µm Nylon-Filter, Nalgene) wurde und anschließend vorsichtig in druckbeständige 1 L-Behälter gefüllt wurde. Bei Eluenten mit Natriumhydroxid wurde eine 50%ige Natriumhydroxid-Lösung (Fluka, Produkt-No. 72064) zugegeben, um eine Kontamination mit Carbonat zu minimieren, die einen Verlust der Chromatographieauflösung und -effizienz verursacht. Im Anschluss wurden die Eluenten mit Helium 5.0 für ca. 10 min durchströmt und anschließend ein permanenter Druck von 5-8 psi mit Helium angelegt.

Die zu analysierenden Proben waren Kulturüberstände. Dabei wurden Proben aus Wachstumsexperimenten genommen, die Zellen gekühlt in einer Tischzentrifuge pelletiert (15000 rpm, 20 min, 4°C) und der Kulturüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Zur Analyse durch Ionenchromatographie wurden die Proben in geeigneter Weise ebenfalls mit Milipore-H<sub>2</sub>O verdünnt. Standards der zu analysierenden Substanzen wurden in Milipore-H<sub>2</sub>O gelöst, ebenfalls verdünnt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.11.1.1. Quantitative Bestimmung von Zuckern

Zucker konnten sowohl mit dem DX-500 System als auch mit dem ICS-3000 System analysiert werden. Für das DX-500 System standen die Säulen CarboPac™ MA1 als auch die CarboPac™ PA1 zur Verfügung. Mit diesen Säulensystemen konnte eine Trennung der verschiedenen Zucker über eine isokratische Methode erzielt werden. Die Detektion erfolgte dabei elektrochemisch.

#### Generelle Parameter zur Durchführung mit der CarboPac™ MA1 Säule:

System:	DX-500
Säulen:	CarboPac™ MA1 (4 x 250 mm) CarboPac™ MA1 Guard (4 x 50 mm)
Flussrate:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	10 µL
Temperatur:	Raumtemperatur
Detektion:	integrierte gepulste Amperometrie, Goldelektrode
Eluenten:	A: Wasser B: 1 M NaOH

#### Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	52	48
70.0	52	48

#### Waveform elektrochemischer Detektor:

Zeit (sec)	Potential (V) vs. Ag/AgCl	Integration
0.00	0.10	
0.20	0.10	Start
0.40	0.10	Ende
0.41	-2.00	
0.42	-2.00	
0.43	0.60	
0.44	-0.10	
0.50	-0.10	



Generelle Parameter zur Durchführung mit der CarboPac™ PA1-Säule:

System:	DX-500
Säulen:	CarboPac™ PA1 (4 x 250 mm) CarboPac™ PA1 Guard (4 x 50 mm)
Flussrate:	1,0 mL/min
Injektionsvolumen:	10 µL
Temperatur:	Raumtemperatur
Detektion:	integrierte gepulste Amperometrie, Goldelektrode
Eluenten:	A: Wasser B: 1 M NaOH

Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	75	25
70.0	75	25

*Waveform* elektrochemischer Detektor: siehe Durchführung CarboPac™ MA1-Säule

Für das ICS-3000 System stand die analytische Säule AminoPac™ PA10 zur Verfügung, die zwar hauptsächlich zur Trennung von Aminosäuren verwendet wurde, mit der man aber auch die verschiedenen Zucker mittels eines Gradienten auftrennen konnte. Hierbei war zu beachten, dass bei der Herstellung des Acetat-Eluenten eine Ausnahme gemacht wurde. Natriumacetat wurde hier zuerst in Milipore-H<sub>2</sub>O gelöst und erst im Anschluss sterilfiltriert. Danach wurde wie bei 2.11.1 beschrieben das Natriumhydroxid gelöst und der Eluent begast.

## Material und Methoden

---

### Generelle Parameter zur Durchführung mit der AminoPac™ PA10-Säule:

System:	ICS-3000
Säulen:	AminoPac™ PA10 (2 x 250 mm) AminoPac™ PA1 Guard (2 x 50 mm)
Flussrate:	0,25 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Temperatur:	30°C
Detektion:	integrierte gepulste Amperometrie, Goldelektrode
Eluenten:	A: 10 mM NaOH B: 250 mM NaOH C: 25 mM NaOH + 1 M Natriumacetat

### Waveform elektrochemischer Detektor:

Zeit (sec)	Potential (V) vs. Ag/AgCl	Integration
0.00	-0.20	
0.04	-0.20	
0.05	0.00	
0.21	0.00	Start
0.22	+0.22	
0.46	+0.22	
0.47	0.00	
0.56	0.00	Ende
0.57	-2.00	
0.58	-2.00	
0.59	+0.60	
0.60	-0.20	

Gradientenmethode:

Zeit (min)	Curve Type	A (%)	B (%)	C (%)
0.0	5	79.2	20.8	0.0
2.0	5	79.2	20.8	0.0
8.0	8	66.7	33.3	0.0
11.0	8	66.7	33.3	0.0
18.0	8	45.8	14.2	40.0
21.0	5	50.0	10.0	40.0
23.0	8	21.9	8.1	70.0
42.0	5	21.9	8.1	70.0
42.1	5	20.8	79.2	0.0
44.1	5	20.8	79.2	0.0
44.2	5	79.2	20.8	0.0
55.0	5	79.2	20.8	0.0

## 2.11.1.2. Quantitative Bestimmung von Anionen

Zur Bestimmung von Anionen, v. a. Acetat im Kulturüberstand wurde das ICS-3000 System mit der analytische Säule IonPac<sup>®</sup> AS11-HS in Kombination mit einer vorgeschalteten IonPac<sup>®</sup> AG11-HC Guard-Säule verwendet. Als Suppressor diente der ASRS<sup>®</sup> Ultra II. Die Separation erfolgte mit einem Natriumhydroxid-Gradienten bei einer Flussrate von 0,38 mL/min.

Generelle Parameter zur Durchführung mit der IonPac<sup>®</sup> AS11-HC-Säule:

System:	ICS-3000
Säulen:	IonPac <sup>®</sup> AS11-HC (2 x 250 mm) IonPac <sup>®</sup> AG11-HC Guard (2 x 50 mm)
Flussrate:	0,38 mL/min
Injektionsvolumen:	2,5 µL
Temperatur:	30°C
Detektion:	supprimierte Leitfähigkeit, ASRS <sup>®</sup> Ultra II (2 mm) AutoSuppression recycle mode
Eluenten:	A: Wasser B: 5 mM NaOH C: 100 mM NaOH

### Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0.0	80	20	0
8.0	80	20	0
18.0	85	0	15
28.0	70	0	30
38.0	40	0	60
40.0	40	0	60
40.1	80	20	0
50.0	80	20	0

### 2.11.1.3. Quantitative Bestimmung von Kationen

Die Detektion von Trimethylamin und Betain erfolgte isokratisch mittels Leitfähigkeitsmessungen unter Verwendung der analytischen Säule IonPac<sup>®</sup> CS18 und zugehöriger IonPac<sup>®</sup> CG18 Guard-Säule. Für die Detektion von Betain konnte kein Suppressor verwendet werden, da Betain als Zwitterion durch den Suppressor verloren geht und somit nicht gemessen werden kann.

#### Generelle Parameter zur Durchführung mit der IonPac<sup>®</sup> CS18-Säule:

System:	ICS-3000
Säulen:	IonPac <sup>®</sup> CS18 (2 x 250 mm) IonPac <sup>®</sup> CG18 Guard (2 x 50 mm)
Flussrate:	0,25 mL/min
Injektionsvolumen:	5 µL
Temperatur:	40°C
Detektion:	Leitfähigkeit
Eluenten:	A: Wasser B: 10 mM Methansulfonsäure

Methode:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0.0	70	30
70.0	70	30

## 2.11.2. Quantitative Bestimmung von Ethanol

Zur quantitativen Bestimmung von Ethanol aus Kulturüberständen wurde ein UV-Test der Firma R-BIOPHARM verwendet. Nach geeigneter Verdünnung der Proben erfolgten die Messungen bei einer Wellenlänge von 340 nm mit einem UV/VIS-Spektrometer bei Raumtemperatur. Die Ansätze wurden nach Anleitung des Herstellers pipetiert, mit dem Unterschied, dass bei dieser Arbeit das Probenvolumen 1mL betrug.

## 2.11.3. Gas-Chromatographie

Die qualitative und quantitative Detektion von v. a. Ethanol in Kulturüberständen erfolgte mit Hilfe des Gaschromatographen GC-2010 der Firma Shimadzu. Zur Detektion wurde eine Stabilwax-DA-Säule verwendet. Als Trägergas diente Stickstoff. Um eine Quantifizierung der Proben zu ermöglichen, wurde vor den Messungen eine Kalibrierung der interessanten Substanzen mit verschiedenen bekannten Konzentrationen (0,000001 – 0,1 g/L) durchgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen sollten für eine gute Quantifizierung innerhalb der Kalibriergrenzen liegen. Außerdem wurden bei jedem Probenlauf drei verschiedene Konzentrationen eines Standardgemisches mitgemessen um die Möglichkeit von Messfehlern zu minimieren. Dieses Standardgemisch wurde mit angesäuertem Wasser (pH 2,5, eingestellt mit HCl) verdünnt. Die Proben wurden ebenso behandelt wie bei der Ionenchromatographie. Zu 9/10 Vol. Probe wurde 1/10 Vol. interner Standard gegeben. Als interner Standard diente 1-Propanol in einer finalen Konzentration von 0,005 g/L.

Methode:

Zeit (min)	Temperatur (°C)
0.0	70
5.0	98
25.0	250

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GC solution Version 2.3 von Shimadzu.

### 2.12. Annotation und Sequenzanalyse

Das Genom wurde in Zusammenarbeit mit dem Genomlabor der Universität Göttingen sequenziert. Die Sequenzierung, Sequenzverbesserung und Lückenschluss wurden von Dr. Arnim Wiezer durchgeführt. Nachdem ein Großteil des *C. ljungdahlii* Genoms sequenziert war, wurde mit der Annotation begonnen. Bis zum endgültigen Schließen des Genoms wurde die Annotation regelmäßig einer Prüfung unterzogen und bei Bedarf erneuert.

Unter Annotation versteht man die Identifizierung aller potentiellen Gene und die Zuweisung einer wahrscheinlichen Funktion, falls dies möglich ist.

#### 2.12.1. ORF-Vorhersage

Bevor mit der Annotation begonnen werden konnte, mussten zuerst alle potentiellen offenen Leserahmen („Open reading frame“ – ORF) identifiziert werden. Dies geschah durch die Verwendung des Programms YACOP (M. Tech & Merkl, 2003), welches die Programme Critica, GLIMMER und ZCurve miteinander kombiniert (Badger & Olsen, 1999; Delcher *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2003). tRNAs wurden mittels des Programms tRNAscan-SE bestimmt (Lowe & Eddy, 1997). Mit Hilfe des Programms Artemis (Rutherford *et al.*, 2000) konnten die durch YACOP gefundenen potentiellen ORFs auf ihre korrekte Länge überprüft werden. Kriterien hierfür waren eine einheitliche „Codon-Usage“ vom Start- bis zum Stoppcodon – dargestellt in Form eines „GC FramePlot“ – und das Vorhandensein einer Ribosomenbindestelle mit der Consensus-Sequenz AGGAGG im Abstand von ca. 7-10 Nukleotiden vor dem Startcodon. Außerdem wurden in diesem Programm zusätzliche ORFs in der Sequenz eingetragen, die nicht von YACOP erkannt wurden. Dafür wurden nur potentielle ORFs berücksichtigt, die aus 150 bp oder mehr bestanden und nach einem Abgleich mit der NCBI-Sequenzdatenbank eine genügend große Sequenzähnlichkeit zu ORFs aus anderen Organismen hatten.

### 2.12.2. Genomweite Annotation mit ERGO

Für die Annotation wurde das Programm ERGO verwendet (Fa. Integrated Genomics, Arlington Heights, USA) (Overbeek et al., 2003). Dabei wurde zuerst eine automatische Annotation durchgeführt, bei der die in Artemis festgesetzten Gene in Proteinsequenzen übersetzt wurden und dies mittels FASTA (Griffin *et al.*, 1994; Pearson & Lipman, 1988) gegen eine nichtredundante Proteindatenbank abgeglichen wurden. Die nicht-redundanten Datenbanken bestanden aus Swiss-Prot, TrEMBL und TrEMBL new.

Nach der automatisch durchgeführten Annotation wurde diese für jedes Protein nochmals manuell verifiziert. Dabei wurden externe Programme ebenso genutzt, wie Programme, die in die Benutzeroberfläche von ERGO eingebunden waren. Zu den intern genutzten Programmen gehörten die Vorhersage membranspannender Regionen durch das Programm TMPred (Hofmann K. & Stoffel, 1993), Sequenzvergleiche auf Basis von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sowie Clustervergleiche durch die Funktion „contig regions“. Als Vergleich diente eine lokale Genom-Datenbank mit insgesamt 401 Referenzorganismen. Ebenso wurden externe Sequenzvergleiche in den Datenbanken von TrEMBL und Swiss-Prot durchgeführt, wobei Swiss-Prot Einträge zuverlässiger waren, da diese manuell überprüft werden. Außerdem wurden die Programme InterProScan und NCBI CD-Search zur Domänenuntersuchung verwendet (Hunter *et al.*, 2012; Marchler-Bauer *et al.*, 2005; Quevillon *et al.*, 2005).

### 2.13. Hybridisierung und Auswertung von Microarrays

Die Genexpressionsanalyse dient der Untersuchung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung zellulärer mRNA, wofür typischerweise die relativen Expressionsstärken zweier Proben miteinander verglichen werden. Bei diesen Proben handelt es sich um RNA, welche aus Zellen gewonnen wird, die zum einen unter Standard- oder Referenzbedingungen und zum anderen unter den experimentell zu untersuchenden Bedingungen gewachsen sind. Die für die Hybridisierung verwendete RNA (*target*) wird mit den fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert. Diese bindet an die immobilisierten Nukleinsäuresequenzen (*probes*) auf der Oberfläche des DNA-Microarrays. Die jeweils korrespondierenden Fluoreszenzsignale der beiden Farbstoffe können nach der Hybridisierung der *probes* mit den *targets* unabhängig voneinander detektiert werden. Die

Verwendung von Fluoreszenz ermöglicht, im Vergleich zu einer radioaktiven Markierung, neben höherer Sensitivität und Auflösung, das Auswerten von zwei oder mehreren verschiedenen Signalen in einem Experiment. Im Anschluss an eine Normalisierung der Daten kann die Intensität der Hybridisierungssignale miteinander verglichen werden. DNA-Microarrays geben keine Information über die absoluten Expressionsstärken in den untersuchten Proben, da die Fluoreszenzsignale u. a. von der Anzahl der eingebauten Farbstoffmoleküle und der Lage zueinander abhängt („Quenching effect“). Dies wird durch die variable Nukleotidsequenz der Gene bestimmt.

### 2.13.1. Markierung von RNA mit Cy3/Cy5 Fluoreszenzfarbstoff

Die Markierung der isolierten RNA (2.6.3) erfolgte über eine reverse Transkription mit ‚*random hexamers*‘. Während des Umschreibens der RNA in cDNA werden mit CyDye markierte dCTPs eingebaut, die restlichen dNTPs werden als 4/10 dCTP Nukleotid Mix (4 mM dCTP und jeweils 10 mM dATP, dGTP und dTTP) zugegeben. Außer den verwendeten Cyanin-Farbstoffen und dNTPs lagen die weiteren Komponenten des Ansatzes der reversen Transkription der verwendeten SuperScript® III Reverse Transcriptase bei. Die Reaktionsansätze wurden ab dem Zeitpunkt der Farbstoffzugabe vor Licht geschützt, da die Farbstoffe lichtempfindlich sind.

Als erster Schritt erfolgte das Annealing der Hexamerprimer an die RNA. Dazu wurden pro Ansatz 25 µg RNA verwendet.

#### Annealing-Ansatz:

25	µg	RNA
3	µL	<i>random hexamers</i> (5 µg/µL)
ad 10	µL	H <sub>2</sub> O

Dieser Ansatz wurde für 10min bei 70°C inkubiert, damit sich die Primer an die RNA anlagern können. Anschließend werden die Ansätze auf Eis gestellt und die restlichen Komponenten der Reversen Transkription auch auf Eis zupipetiert.



Ansatz für reverse Transkription

10	µL	Annealing-Ansatz
4	µL	5x <i>first strand</i> Puffer
2	µL	0,1 M DTT
2	µL	dCTP Nukleotid-Mix
1	µL	dCTP CyDye-markierte Nukleotide (Cy <sup>TM</sup> 3-dCTP oder Cy <sup>TM</sup> 5-dCTP)
1	µL	SuperScript <sup>®</sup> III Reverse Transcriptase (200U/µL)

Die Ansätze wurden nach kurzem Mischen abzentrifugiert und 4-5 h bei 42°C inkubiert.

Um die Template RNA und nicht eingebauten Farbstoff zu entfernen, erfolgte anschließend eine Aufreinigung der markierten cDNA. Zunächst wurde die RNA durch Zugabe von 2 µL 2,5 M NaOH hydrolysiert. Die Ansätze wurden dafür 15 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss zur Neutralisierung 10 µL 2 M HEPES zugegeben. Im Anschluss erfolgte eine weitere Aufreinigung mit dem illustra<sup>TM</sup> CyScribe<sup>TM</sup>GFX<sup>TM</sup> Purification Kits. Hierbei wurde jeder Ansatz zusammen mit 500 µL Capture Buffer auf je eine Säule gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Säulen abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min) und der Durchfluss verworfen. Die Säulenmembran wurde nun 4x mit 600 µL Waschpuffer gewaschen (13000 rpm, 1 min zentrifugieren) und als letzten Schritt die Membran durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 s) getrocknet. Danach erfolgte die Elution in ein neues Reaktionsgefäß, indem 40 µL 70°C warmer Elutionspuffer auf die Membran gegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Die Eluate mit der markierten cDNA wurden bis zur Hybridisierung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Um die Proben zu quantifizieren, wurden NanoDrop die cDNA Konzentration und die eingebaute Menge an Farbstoff bestimmt. Anschließend wurde die Menge an eingebauten Farbstoff pro µg ssDNA berechnet. Ideal war ein Wert von 15-60 pmol/µg ssDNA je Farbstoff, da dann die Normalisierungswerte meist sehr gut waren.

### 2.13.2. Hybridisierung der *probes* mit markierter *target*-cDNA

Die Hybridisierung der *probes* mit der markierten *target*-cDNA erfolgte vollautomatisch. Dafür standen zwei verschiedene Hybridisierstationen zur Verfügung: Einerseits der Automated Slide Processor, andererseits die Tecan Hybridization Station HS400Pro. Vorbereitend wurden jeweils 80-100 pmol Farbstoff je Probe in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben, die *target*-cDNA für 5 min bei 95°C denaturiert und sofort im Anschluss auf Eis gekühlt. Anschließend wurde Tom-Freeman-Hybridisierungspuffer zugegeben.

<b>Tom-Freeman-Hybridisierungspuffer</b> (Fitzpatrick et al., 2005)	
Formamid (deionisiert)	20 mL
50x Denhart's solution	5 mL
20x SSC	12,5 mL
100mM Na-Pyrophosphat	0,5 mL
1M Tris (pH 7,4)	2,5 mL
10% SDS	0,5 mL
HPLC-H <sub>2</sub> O	9 mL

Lösung sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

#### Automated Slide Processor von ASP Lucidea

Bei Verwendung des Automated Slide Processor wurde der Ansatz auf ein Volumen von 220 µL mit Tom-Freeman-Puffer aufgefüllt, gemischt und abzentrifugiert. Anschließend wurden 200 µL des Hybridisieransatzes mit einer Hamiltonspritze in die Hybridisierungskammer des ASP, in welche bereits ein gespotteter Microarray eingespannt wurde, injiziert. Die Hybridisierung erfolgte mit folgendem Programm:

#### ASP-Hybridisierungsprogramm:

00	Wait	Check dummy slides (Überprüfen, ob in jeder Kammer ein dummy Slide ist)
01	Flush	Leeren der Schläuche und Kammern von alten Lösungen
02	Heat	Kammern auf 48°C aufheizen
03	Flush	Kammern mit Isopropanol spülen
04	Flush	mit Luft spülen
05	Air Pump	Kammern mit Luft trocknen

06	Heat Switch Off	Heizung ausschalten
07	Prime	Schläuche mit Wash 1 (Lösung 3) füllen
08	Wait	INSERT TEST SLIDES - Test slides einlegen
09	Heat	Kammern auf 45°C aufheizen
10	Wait	Inject probe solution – Proben-Lösung injizieren
11	Mix	mischen der Lösungen in den Kammern für 15 Stunden
12	Heat Switch Off	Heizung ausschalten
13	Flush	mit Wash 1 spülen
14	Mix	Mischen mit Wash 1 für 2 min
15	Flush	mit Wash 1 spülen
16	Prime	Schläuche mit Wash 3 (Lösung 2) füllen
17	Flush	Mit Wash 3 spülen
18	Flush	Kammern mit Luft spülen
19	Heat	Kammern auf 37°C aufheizen
20	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
21	Flush	mit Isopropanol spülen
22	Flush	Kammern mit Luft spülen
23	Flush	Kammern mit Luft spülen
24	AirPump	Kammern mit Luft trocknen
25	Heat Switch Off	Heizung ausschalten
26	Wait	REMOVE TEST SLIDES Test slides entfernen und mit dummy slides ersetzen
27	Heat	Heizen auf 48°C
28	Flush	mit Wash 2 spülen
29	Mix	Mischen mit Wash 2 für 5 min
30	Prime	Schläuche mit Wasser füllen
31	Flush	mit 6 mL Wasser spülen
32	Mix	Mischen mit Wasser für 5 min
33	Flush	mit 6 mL Wasser spülen
34	Flush	mit Luft spülen
35	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
36	Flush	mit Isopropanol spülen
37	Flush	mit Luft spülen
38	Air Pump	Kammern mit Luft trocknen

[Ende]

## Material und Methoden

---

### Erläuterung 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 User

### Lösungen:

Lösung 1:	H <sub>2</sub> O
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

Bei dieser Hybridisierstation wurden die Slides mit Luft und Isopropanol getrocknet, im Gegensatz dazu wurde bei der Tecan Hybridization Station Stickstoff mit leichtem Druck über die Slides gepumpt, um diese zu trocknen.

### Tecan Hybridization Station

Hier wurde der denaturierte Hybridisierungsansatz mit Tom-Freeman-Puffer auf 150 µL aufgefüllt, gemischt und abzentrifugiert. Nachdem der Microarray in die Hybridisierungskammer eingespannt wurde, wurde das Programm gestartet und die Lösung nach Aufforderung durch das Programm mit einer Pipette in die Hybridisierungskammer injiziert. Die Hybridisierung erfolgte nach folgendem Programm:

1	Wash	Temp: 45°C	First: Yes	Channel: 4	Runs: 1
		Wash time: 0:00:30	soak time: 0:00:00		
2	Sample Injection	Temp: 45°C	Agitation: Yes	BCR: No	
3	Hybridization	Temp: 45°C	Agitation Frequency: Low		
		High Viscosity Mode: No	Time: 15:00:00		
4	Wash	Temp: 25°C	First: No	Channel: 3	Runs: 1
		Wash time: 0:02:30	soak time: 0:00:30		
5	Wash	Temp: 25°C	First: No	Channel: 3	Runs: 1
		Wash time: 0:01:10	soak time: 0:00:00		
6	Wash	Temp: 25°C	First: No	Channel: 4	Runs: 3
		Wash time: 0:01:10	soak time: 0:00:00		
7	Slide Drying	Temp: 30°C	Time: 0:03:00		
		Final Manifold Cleaning: Yes	Channel: 1		

Lösungen:

Channel1: H<sub>2</sub>O

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

Channel 4: 0,1x SSC

### 2.13.3. Quantifizierung der Arraydaten mit ‚GenePix Pro 4.0‘

Zur Verarbeitung der Hybridisierungsdaten wurden diese mit dem Scanner GenePix 4000B und der Software GenePix 4.0 oder 6.0 visualisiert. Bereits während des Scannens erfolgt eine erste Normalisierung der Arraydaten anhand von Prescans. Dabei wurde die Scanstärke (PMT (Photomultiplier-tube) 635 nm – Cy5, PMT 532 nm – Cy3) für die beiden Farbstoffe anhand der Fluoreszenz von Spots für Haushaltsgenen ermittelt, da bei diesen Genen die Fluoreszenzintensität ein Verhältnis von 1:1 ergeben sollte. Anschließend erfolgte der Hauptscan mit folgenden Einstellungen:

<i>Pixel size:</i>	10	µm
<i>Lines to average:</i>	1	
<i>Focus position:</i>	0	µm
<i>Scan area:</i>	ca. 2000 x 7000 Pixel	

Für die Quantifizierung der Fluoreszenzwerte jedes einzelnen Spots in ‘Gene Pix’ wurde zunächst mit der Software eine Art Schablone auf den Chip gelegt, womit jedem Spot die entsprechende Annotation zugewiesen und er auszuwertende Bereich festgelegt wurde. Mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten Computerprogramms (Ehrenreich, unveröffentlicht) wurde die Schablone, basierend auf einer Excel-Belegungsliste (Microsoft, Redmond, USA), in Form eines *gal files* generiert. Die Ausrichtung dieser Schablone wurde für jeden einzelnen Spot manuell überprüft. Die Berechnung der Fluoreszenzwerte, des Hintergrunds und der Standardabweichung des Hintergrunds für beide Farbstoffe, sowie des *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und dem *Regression Ratio* erfolgte für jeden Spot automatisch durch das Programm GenePix Pro. Bei den *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und dem *Regression Ratio* handelt es sich um jeweils unterschiedliche mathematische Ansätze zur Ermittlung des mittleren Expressionswertes eines Spots. Jeder Spot besteht aus einer Vielzahl von einzelnen Bildelementen (Pixel), für welche jeweils ein Wert der Pixel-Intensität für die Wellenlänge 1 ( $I_{P,\lambda 1}$ ) und der Pixel-Intensität für die Wellenlänge 2 ( $I_{P,\lambda 2}$ ) vorliegt. Die Intensitäten der zwei Wellenlängen der den definierten Spot umgebenden Hintergrund-Pixel werden ebenfalls mit einbezogen ( $I_{B,\lambda 1}$  und  $I_{B,\lambda 2}$ ). Das mittlere Fluoreszenzverhältnis eines Spots wird aus den einzelnen Pixel-Intensitäten berechnet. Der *Ratio of Medians*, der dem geometrischen Mittel entspricht, wird häufig zur Berechnung von Mittelwerten herangezogen, da starke Abweichungen einzelner Werte aus mathematischen Gründen das Endergebnis weniger beeinflussen.

*Ratio of Medians:*

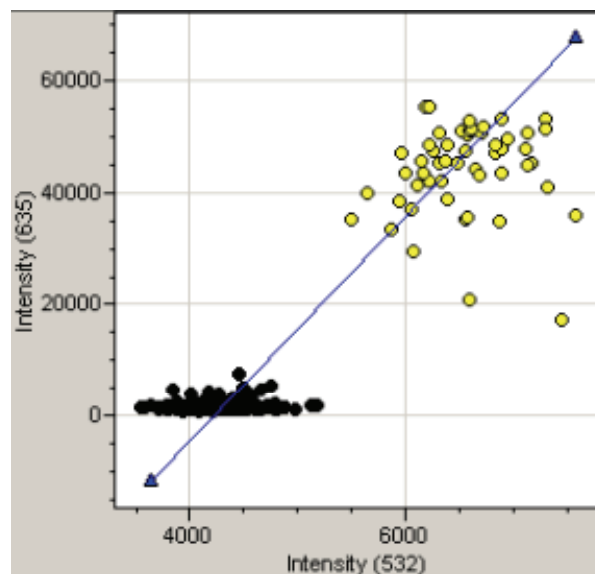
$$\frac{\{(I_{P,\lambda 2})_n\}_{med} - \{(I_{B,\lambda 2})_n\}_{med}}{\{(I_{P,\lambda 1})_n\}_{med} - \{(I_{B,\lambda 1})_n\}_{med}}$$

Der Wert des *Ratio of Means* hingegen kann mehr von starken Abweichungen einzelner Pixelwerte beeinflusst werden. Der Wert des *Ratio of Means* errechnete sich wie folgt:

*Ratio of Means*:

$$\frac{\sum_{i=1}^n \langle I_{P,\lambda_2} - \{(I_{B,\lambda_2})_m\}_{med} \rangle_i}{\sum_{i=1}^n \langle I_{P,\lambda_1} - \{(I_{B,\lambda_1})_m\}_{med} \rangle_i}$$

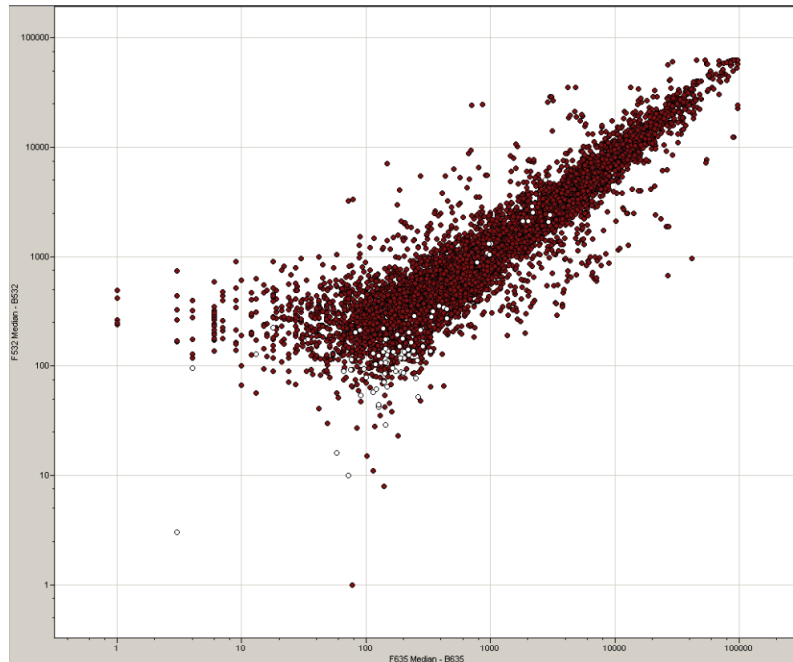
Zur Berechnung des *Regression Ratios* ist die Definition von Pixeln, die zu dem eigentlichen Spot gehören, und der Hintergrund-Pixel durch die aufgelegte „Schablone“ nicht nötig. Jeder Pixel innerhalb des zweifachen Spotdurchmessers, unabhängig von seiner Position, wird einbezogen. Das Verhältnis der beiden Wellenlängen zueinander wird mittels linearer Regression zwischen den zwei sich ergebenden Pixelwolken ermittelt (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: *Regression Ratio* eines einzelnen Spots.** Aufgetragen sind die Intensitäten der einzelnen Pixel bei 532 nm gegen die Intensitäten bei 635 nm. Die schwarzen Punkte liegen im Hintergrund, die gelben heben sich vom Hintergrund ab. Die blaue Linie stellt die mathematisch ermittelte Regressionsgerade dar, ihre Steigung gibt das durchschnittliche Verhältnis der Pixelintensitäten und damit der *Regression Ratio* an.

Die Ergebnisse konnten in Form einer Datentabelle und eines Scatterplots eingesehen werden. An dieser Stelle erfolgte eine weitere Normalisierung der Daten. Unter der Voraussetzung, dass sich unter den zu vergleichenden Bedingungen nur die Expression vereinzelter Gene verändert und die Expression eines Großteils der Gene unverändert bleibt, wurde im

Scatterplots die Hauptwolke der Gene auf die Winkelhalbierende gelegt, also in den Bereich eines Regulationsfaktors von 1. Eine logarithmische Auftragung der Expressionswerte vereinfacht dieses Verfahren zusätzlich, da Spots mit einem Expressionsfaktor von annähernd 1 gestaucht werden und sich die Dichte der Hauptwolke der Daten erhöht (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: Logarithmische Auftragung der Expressionswerte eines Microarrays als Scatterplot durch das Programm GenePix.** Die Hauptwolke der Gene liegt nach der Normalisierung im Bereich der Winkelhalbierenden.

### 2.13.4. Analyse der Transkriptionsdaten

Für die weitere Bearbeitung und Analyse der normalisierten Transkriptionsdaten wurden diese aus GenePix in Excel exportiert. Alle Daten wurden daraufhin gefiltert, dass die Fluoreszenzsignale für Rot und Grün selbst, und nach Abzug der Standardabweichung des Backgrounds einen Wert größer Null besaßen. Ein weiteres Merkmal für die Qualität eines Spots war, dass die nach unterschiedlichen mathematischen Verfahren berechneten Expressionsverhältnisse – *Ratio of Medians*, *Ratio of Means* und der *Regression Ratio* – für einen Spot nicht mehr als 30 % voneinander abweichen. Bei starken Diskrepanzen dieser Werte, kann man methodische Artefakte nicht ausschließen. Im Anschluss an die Evaluation der Daten wurden alle ORFs deren Expression sich unter den jeweiligen Bedingungen mindestens um einen Faktor 2 änderten, herausgefiltert, mit anderen Chipdaten verglichen und stoffwechsellanalytisch beurteilt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Das Genom von *C. ljungdahlii*

Das Genom von *C. ljungdahlii* ist bisher das zweite Genom eines homoacetogenen Organismus, nach *Moorella thermoacetica*, das bisher komplett sequenziert wurde. Im Nachfolgenden soll jedoch nicht der Versuch unternommen werden, eine vollständige Rekonstruktion der potentiellen metabolischen Fähigkeiten des Organismus zu entwerfen. Es soll vielmehr versucht werden, einen Überblick über die Hauptstoffwechselwege von *C. ljungdahlii* zu gewinnen und auch auf Besonderheiten hinzuweisen, v. a. in Bezug auf das autotrophe Wachstum und mögliche energiestoffwechselrelevante Gene. Die Genomsequenz von *C. ljungdahlii* ist veröffentlicht (Köpke *et al.*, 2010) und ist bei NCBI unter der Zugangsnummer CP001666.1 frei zugänglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ORFs, die durch bioinformatische Programme bestimmt wurden, nochmals „per Hand“ kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert und zusätzliche ORFs eingefügt. Desweiteren wurde das Genom annotiert und versucht, den Stoffwechsel möglichst genau zu rekonstruieren. Nachfolgend werden einige Stoffwechselwege und Enzymkomplexe eingehender behandelt.

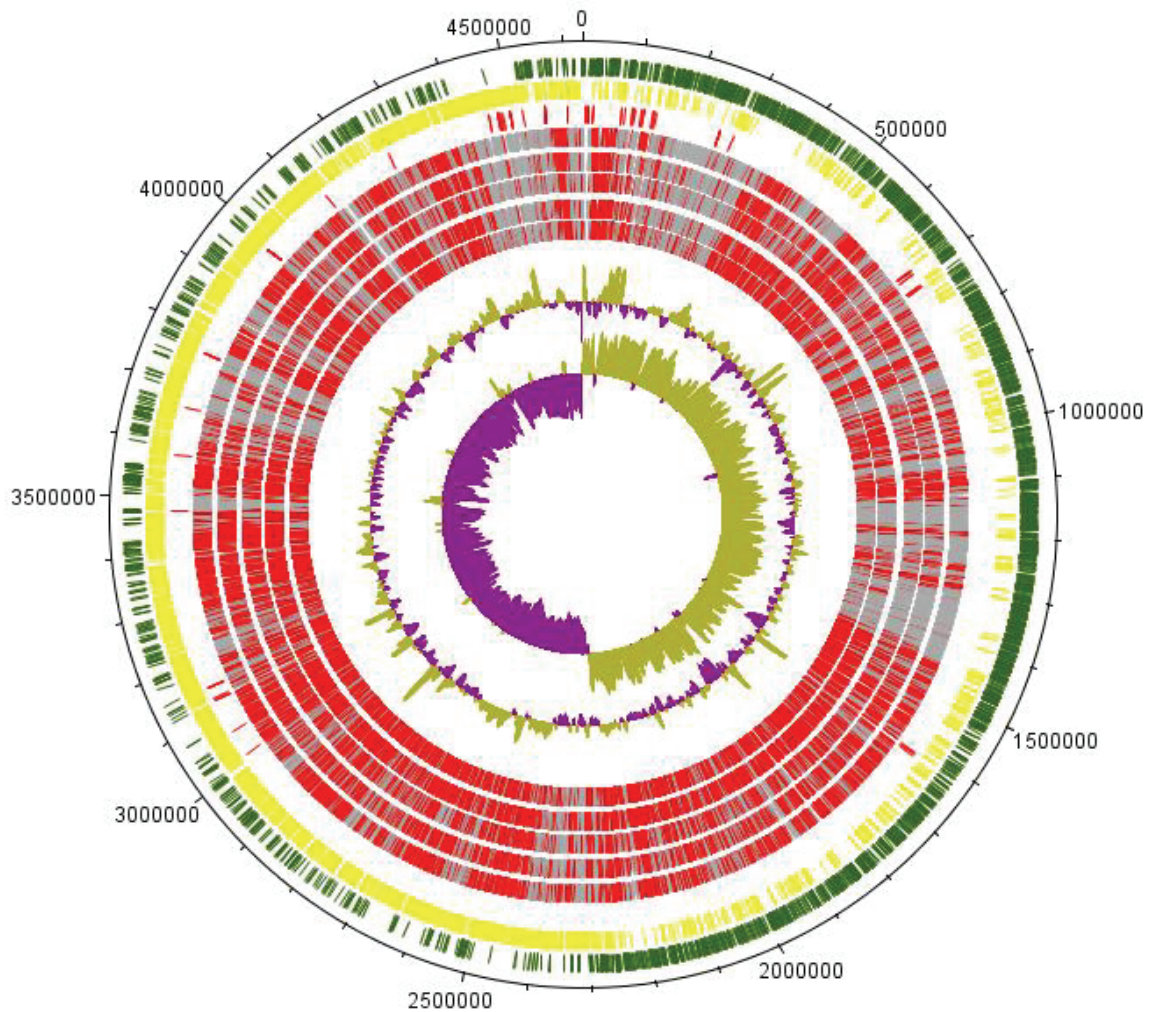
##### 3.1.1. Allgemeine Eigenschaften

Das Genom von *C. ljungdahlii* besteht aus einem Chromosom mit einer Größe von ca. 4,6 Mb und einem GC-Gehalt von 31 mol%. Es konnten 4198 CDS identifiziert werden von denen 77,4% auf dem *leading strand* kodiert sind. Plasmide konnten nicht nachgewiesen werden. Tab. 6 gibt einen Überblick über die allgemeinen Eigenschaften des Chromosoms von *C. ljungdahlii* im Vergleich zu *C. kluyveri* (Seedorf *et al.*, 2008), *C. acetobutylicum* (Nolling *et al.*, 2001), *C. beijerinckii* (George *et al.*, 1983; Keis *et al.*, 2001) (Sequenz: NC\_009617.1), *C. difficile* (Monot *et al.*, 2011; Sebaihia *et al.*, 2006b), *C. novyi* (Bettegowda *et al.*, 2006) und *M. thermoacetica* (Pierce E., 2008).

**Tab. 6: Vergleich der allgemeinen Eigenschaften des Genoms von *C. ljungdahlii* mit anderen Clostridien**

	Genomgröße (bp)	GC-Gehalt (Mol%)	DNA Replikons	CDS	Ribosomale RNA-Operons	Anzahl der tRNAs
<i>C. ljungdahlii</i>	4,630,065	31	1	4,198	9	72
<i>C. kluyveri</i>	4,023,800	32	2	3,912	7	61
<i>C. acetobutylicum</i>	4,132,880	31	2	3,848	11	73
<i>C. beijerinckii</i>	6,000,632	29	1	5,020	14	94
<i>C. difficile</i>	4,298,133	29	2	3,757	11	87
<i>C. novyi</i>	2,547,720	29	1	2,325	10	81
<i>M. thermoacetica</i>	2,628,784	56	1	2,615	1	51

Das Genom von *C. ljungdahlii* ist mit einer Größe von 4,6 Mb beträchtlich größer als das Genom von *M. thermoacetica* mit 2,6 Mb, einem anderen homoacetogenen Organismus. Ansonsten liegt die Genomgröße im normalen Rahmen der clostridialen Genome mit Ausnahme der Pathogenen *C. tetani* mit 2,87 Mb (Brüggemann *et al.*, 2003) oder *C. novyi* mit 2,55 Mb (Bettegowda *et al.*, 2006). Der GC-Gehalt liegt im Durchschnitt und ist für Clostridien typisch, unterscheidet sich jedoch beträchtlich von *M. thermoacetica* mit 56 %. Es konnten 9 ribosomale rDNA-Cluster und 72 tRNA-Gene entdeckt werden. Zusätzlich konnten zwei mögliche Regionen mit Prophagen (CLJU\_c03280 – CLJU\_c03800 bzw. CLJU\_c16550 – CLJU\_c17000) im Genom lokalisiert werden.



**Abb. 8: Schematische Darstellung des Chromosoms von *C. ljungdahlii*.** Die beiden äußeren Ringe geben die Orientierung der CDS auf dem Leit- (grün) bzw. auf dem Gegenstrang (gelb) wieder; im 3. Ring sind die Positionen der rRNA- und tRNA-Gene dargestellt. Die Ringe 4-8 stellen das Ergebnis einer BiBaG-Analyse des Genoms von *C. ljungdahlii* mit dem von *C. kluyveri* (Ring 4), *C. novyi* (Ring 5), *C. beijerinckii* (Ring 6), *C. tetani* (Ring 7) und *C. acetobutylicum* (Ring 8) dar; rote Bereiche stellen Orthologe dar, graue Bereiche Gene, zu denen keine Orthologen gefunden wurden. Ring 9 zeigt die Abweichungen vom durchschnittlichen GC-Gehalt auf, Ring 10 stellt den „GC-Skew“ dar.

*C. ljungdahlii* wurde mit Hilfe von BiBaG-Analysen mit anderen Arten der Gattung *Clostridium* verglichen. Eine graphische Übersicht des Genomvergleichs ist in Abb. 8 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass in allen Vergleichsorganismen zwischen 2102 und 2745 Gene von *C. ljungdahlii* (entspricht 49,7 bis 64,9 % der Gene) keine oder maximal 25 % Identität auf Aminosäureebene besitzen (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Vergleich des Genoms von *C. ljungdahlii* mit *C. kluveri*, *C. novyi*, *C. beijerinckii*, *C. tetani*, *C. acetobutylicum* und *M. thermoacetica* durch eine BiBaG-Analyse: dargestellt ist die Anzahl der Gene, die auf Basis der AS-Sequenz eine Übereinstimmung zwischen 100-75 %, 75-25 % und 0-25 % zu Genen der Referenzorganismen aufweisen; die ermittelten Werte basieren auf einem globalen Alignment nach Needleman-Wunsch.

Identität	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. kluveri</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. tetani</i>	<i>M. thermoacetica</i>
>75%	914	823	1607	723	680	138
75–25%	1029	1254	519	760	823	1070
<25%	2285	2151	2102	2745	2725	3020

Die größte Ähnlichkeit der Genome besitzt *C. ljungdahlii* mit *C. kluveri*, da hier die Anzahl der Orthologen mit 38 % der Gene (75-100 % Identität) den größten Wert aufweist. Jedoch weisen auch 2102 Genen keine oder nur geringe Übereinstimmungen in *C. ljungdahlii* auf. Der Anteil der Gene mit Ähnlichkeiten von 25-75 % fällt mit 12,3 % vergleichsweise gering aus. Alle anderen der hier genannten Vertreter der Gattung Clostridium besitzen mit 16,1 % in *C. tetani* bis 21,6 % in *C. acetobutylicum* nur einen beträchtlich kleineren Anteil an orthologen Genen. Dafür lassen sich mit 18,0 % in *C. novyi* bis 29,7 % in *C. beijerinckii* mehr Gene identifizieren, die eine Ähnlichkeit von 25-75 % zu Genen von *C. ljungdahlii* aufweisen. Auch zeigt sich, dass bei *C. novyi* und *C. tetani* mit 64,9 % bzw. 64,5 % der protein-kodierenden Gene der größte Anteil der Gene keine Entsprechung (0-25 % Identität) in diesen Organismen hat. *M. thermoacetica* gehört wie *C. ljungdahlii* zu den homoacetogenen Bakterien. Als Vertreter der Gattung *Moorella* besitzt er lediglich 3,3 % orthologe Gene mit einer Identität von 75-100 % im Vergleich zu *C. ljungdahlii*. Dieser Vergleich der Genome gibt im Grunde die Verwandtschaftsverhältnisse von *C. ljungdahlii* mit den aufgeführten Arten wider.

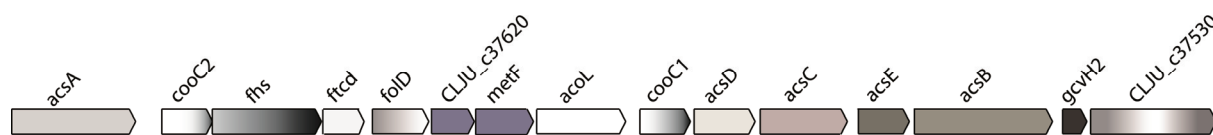
### 3.1.2. Autotrophes Wachstum

In früheren Publikationen wurde schon gezeigt, dass *C. ljungdahlii* auf Synthesegas – einer Mischung aus CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> – wachsen kann. Dabei werden Essigsäure und Ethanol produziert (Cotter *et al.*, 2009a; Najafpour & Younesi, 2006; Tanner *et al.*, 1993; Younesi *et al.*, 2005). Als homoacetogener Organismus verwendet *C. ljungdahlii* den Wood-Ljungdahl Weg, um CO<sub>2</sub> zu fixieren. Dieser Weg ist hauptsächlich an *M. thermoacetica* und *A. woodii* aufgeklärt worden.

### 3.1.2.1. Wood-Ljungdahl-Weg

Homoacetogene Bakterien verwenden den Wood-Ljungdahl Weg, um CO<sub>2</sub> oder CO zu fixieren und es zu Acetyl-CoA umzuwandeln. Dieser Stoffwechselweg wird oft in 2 Zweige eingeteilt: Auf einer Seite wird CO<sub>2</sub> zu einer Methylgruppe reduziert. Dabei wird CO<sub>2</sub> von einer Formiat Dehydrogenase zu Formiat reduziert, das von einer Tetrahydrofolate-(THF)-Synthetase auf THF übertragen wird. Die Formylgruppe wird durch mehrere Enzyme zu Methyl-THF reduziert. Die Methylgruppe wird anschließend von THF auf ein Corrinoid-FeS-Protein übertragen, das einen Teil des CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase Enzymkomplexes (CODH/ACS) darstellt. In dem zweiten Zweig des Stoffwechselwegs wird CO<sub>2</sub> direkt von dem CO-Dehydrogenase/Acetat-SynthaseKomplex fixiert und anschließend zusammen mit der Methylgruppe auf CoA übertragen, so dass ein Molekül Acetyl-CoA entsteht. Dieses wird zum großen Teil durch Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase unter Bildung eines ATP zu Acetat reduziert (Ragsdale & Pierce, 2008).

Im Genom von *C. ljungdahlii* kann man alle Gene, die im Wood-Ljungdahl Weg beschrieben sind, finden. Es gibt 3 Gene, die für eine Formiatdehydrogenase kodieren, wobei zwei dieser Gene (CLJU\_c20040, CLJU\_c06990) Selenoproteine kodieren, CLJU\_c08930 jedoch nicht. Bei einem Sequenzvergleich auf Proteinebene zeigt sich, dass CLJU\_c06990 und CLJU\_c08930 größere Ähnlichkeiten miteinander haben, als die zwei Selenoproteine untereinander. Alle anderen Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs sind im Genom von *C. ljungdahlii* in einem großen, 15 ORFs umfassenden Cluster lokalisiert (Abb. 9). Diese Genanordnung findet man noch in einigen anderen Clostridiaceen: *C. autoethanogenum* (Abrini *et al.*, 1994), *C. ragsdalei*, *C. difficile* (Sebahia *et al.*, 2006a), *C. carboxidivorans* P7 (Bruant *et al.*, 2010; Liou *et al.*, 2005), *C. bartlettii* (Song *et al.*, 2004) und *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF (Ye *et al.*, 2004). *C. autoethanogenum* und *C. ragsdalei* sind sehr nah mit *C. ljungdahlii* verwandt und gehören ebenfalls zur Gruppe der homoacetogenen Bakterien, andere wie *C. difficile* oder *A. metalliredigens* haben im 16S rRNA Stammbaum eine größere Distanz zu *C. ljungdahlii*.



**Abb. 9: Organisation der Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs im Genom von *C. ljungdahlii*.** In diesem Cluster sind die Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs mit Ausnahme der Formiatdehydrogenase organisiert. Gennummer und mögliche Funktion sind in Tab. 8 dargestellt.

In diesem Cluster sind neben den Untereinheiten des CO Dehydrogenase/Acetat Synthase Enzymkomplexes auch die Formiat-THF-Ligase (CLJU\_c37650), das bifunktionale Enzym Methenyl-THF-Cyclohydrolase/Methylen-THF-Dehydrogenase (CLJU\_c37630-40), Methylen-THF-Reduktase (CLJU\_c37610-20) und eine Methyl-THF:Corrinoid/Fe-S-Protein-Methyltransferase (CLJU\_c37560) zu finden. Außerdem sind neben weiteren Genen, deren Bedeutung für den Wood-Ljungdahl Weg unklar ist, zwei Gene, die für ein mögliches Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH kodieren (CLJU\_c37660; CLJU\_c37590). Die Gene in diesem Cluster und ihre möglichen Funktionen sind in nachstehender Tabelle aufgelistet.

**Tab. 8: ORF, Gennummer und mögliche Funktion der Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs, die in Abb. 9 dargestellt sind.**

ORF	Gennummer	Mögliche Funktion
	CLJU_c37530	Protein mit einer Ferredoxin-Domäne
<i>gcvH2</i>	CLJU_c37540	Glycine cleavage System H Protein
<i>acsB</i>	CLJU_c37550	CODH/ACS $\beta$ - Untereinheit
<i>acsE</i>	CLJU_c37560	CODH/ACS Methyltransferase
<i>acsC</i>	CLJU_c37570	CODH/ACS $\gamma$ - Untereinheit
<i>acsD</i>	CLJU_c37580	CODH/ACS $\delta$ - Untereinheit
<i>cooC1</i>	CLJU_c37590	Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH
<i>acoL</i>	CLJU_c37600	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase
<i>metF</i>	CLJU_c37610	Methylen-THF-Reduktase
	CLJU_c37620	mögliche kl. Untereinheit der Methylen-THF-Reduktase
<i>folD</i>	CLJU_c37630	Methylen-THF Dehydrogenase/Methenyl-THF-Cyclohydrolase
<i>ftcD</i>	CLJU_c37640	Formyl-THF-Cyclohydrolase
<i>fhs</i>	CLJU_c37650	Formiat-THF-Ligase
<i>cooC2</i>	CLJU_c37660	Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH
<i>acsA</i>	CLJU_c37670	CODH/ACS $\alpha$ -Untereinheit

### 3.1.2.2. Hydrogenasen

Während des autotrophen Wachstums nutzt *C. ljungdahlii* Hydrogenasen, um Reduktionsäquivalente aus H<sub>2</sub> für die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu generieren. Die Hydrogenasen der Clostridien können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden: Fe-Fe-Hydrogenasen und Fe-Ni-Hydrogenasen. Die Klasse der Fe-Fe-Hydrogenasen ist jedoch keine homogene Gruppe, sondern kann in vier verschiedene Typen eingeteilt werden, abhängig von der Anzahl der Untereinheiten (monomere, dimere, trimere oder tetramere Genstruktur). Im Genom kann man eine Ni-Fe Hydrogenase (CLJU\_c28660-70) und 4 Fe-Fe Hydrogenasen identifizieren (Calusinska *et al.*, 2010). Eine Hydrogenase (CLJU\_c20290) liegt als Monomer vor, zwei weitere liegen als Dimere vor (CLJU\_c07070-80; CLJU\_c17270-80) und die vierte Fe-Fe-Hydrogenase besteht aus drei Untereinheiten (CLJU\_c14700 - 20). Alle Fe-Hydrogenasen scheinen im Cytoplasma lokalisiert zu sein, da nur für die kleine Untereinheit der Ni-Fe-Hydrogenase eine Transmembrandomäne vorhergesagt werden konnte. Des Weiteren sind im Genom Gene für HypEDCF, Hydrogenase maturation Faktor Proteine zu finden (CLJU\_c23060-90), die an der Insertion von Nickel beteiligt sind.

### 3.1.2.3. Anaerobe CO-Dehydrogenase

*C. ljungdahlii* besitzt auch die Fähigkeit auf reinem CO zu wachsen (Tanner *et al.*, 1993). Um CO zu verwenden, stehen dem Organismus zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Einerseits kann CO durch die CO Dehydrogenase Aktivität des CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase-Komplexes reduziert werden, andererseits besitzt *C. ljungdahlii* eine weitere anaerobe CO-Dehydrogenase (CLJU\_c09090-09110), die aus drei Untereinheiten besteht: einer FAD/NAD-abhängigen Oxidoreduktase, einem Elektronentransferprotein mit zwei 4Fe-4S-Cluster und einer katalytischen Untereinheit mit einem 4Fe-4S- und einem Ni-Fe-S-Cluster.

### 3.1.3. Heterotrophes Wachstum

*C. ljungdahlii* kann neben dem autotrophen Wachstum auf Synthesegas oder H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> auch verschiedene Zucker verstoffwechseln. Bereits während der Erstbeschreibung war gezeigt worden, dass dieser Organismus einfache Zucker wie die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose und die Hexosen Fruktose und nach einer Adaptionszeit auch Glukose verwerten

kann. Komplexere Zucker wie Sucrose, Lactose oder Maltose können jedoch nicht verstoffwechselt werden (Tanner *et al.*, 1993). Als weiteres konnte gezeigt werden, dass der Organismus auch Gluconat, eine von Zuckern abgeleitete Säure umsetzen kann (Huhnke *et al.*, 2008). Die Hauptstoffwechselprodukte sind Acetat und in geringen Mengen Ethanol.

### 3.1.3.1. Glykolyse

Fruktose und Glukose werden hauptsächlich über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) verwertet. Fruktose kann dabei über das Fruktose/Mannitol-spezifische Phosphotransferase System (PTS) in die Zelle geschleust und phosphoryliert die Fruktose am C<sub>6</sub>-Atom werden. *C. ljungdahlii* besitzt 2 PTS-Systeme (CLJU\_c20590 und CLJU\_c26050-70), die beide eine Spezifität für Fruktose bzw. Mannitol besitzen. Das entstandene Fruktose-1-Phosphat wird durch eine 1-Phosphofruktokinase (CLJU\_c20600), die in direkter Nachbarschaft zu einem der beiden PTS-Systeme liegt, zu Fruktose-1,6-Bisphosphat konvertiert und anschließend in den EMP-Weg eingeschleust. Für Glukose konnten keine Gene gefunden werden, die für ein Glukose-spezifisches PTS-System kodieren, so dass Glukose über ein anderes, nicht näher spezifizierbares Transportsystem in die Zelle geschleust wird. Glukose kann dann anschließend durch CLJU\_c20810, das für einen transkriptionellen Regulator/Glucokinase kodiert, phosphoryliert werden und als Glukose-6-Phosphat in die Glykolyse eingeschleust werden. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass *C. ljungdahlii* auf Glukose langsamer und erst nach einer Adaptionszeit wächst. Die Gene der Glykolyse sind vollständig vorhanden und die meisten Gene in 2 Clustern auf dem Genom lokalisiert (siehe Tab. 9).



**Tab. 9: Übersicht über die Gene der Glykolyse, der Gluconeogenese und der PTS-Systeme in *C. ljungdahlii*, aufgeführt sind die ORF-Bezeichnungen, Gennummern und die mögliche Funktion der einzelnen Gene**

ORF	Gennummer	Funktion
<b>Glykolyse - Cluster 1</b>		
<i>pfk</i>	CLJU_c03250	6-Phosphofruktokinase
<i>pyk</i>	CLJU_c03260	Pyruvat-Kinase
<b>Glykolyse - Cluster 2</b>		
<i>eno</i>	CLJU_c39110	Enolase
<i>gpm</i>	CLJU_c39120	2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase
<i>tim</i>	CLJU_c39130	Triosephosphat-Isomerase
<i>pgk</i>	CLJU_c39140	Phosphoglycerat-Kinase
<i>gap</i>	CLJU_c39150	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>Gene der Glykolyse - einzeln im Genom lokalisiert</b>		
	CLJU_c20810	Transkriptionsregulator/Glucokinase
<i>pgi</i>	CLJU_c37130	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
<i>fba</i>	CLJU_c02810	Fruktose-Bisphosphat-Aldolase
<i>gap</i>	CLJU_c13400	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>Gluconeogenese</b>		
	CLJU_c29050	Fruktose-1,6-Bisphosphatase
<b>PTS-System</b>		
	CLJU_c40530	Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase
<i>HPr</i>	CLJU_c21910	mögliche HPr Kinase/Phosphorylase
	CLJU_c20590	Fruktose-spezifisches PTS system, IIABC Komponente
<i>fruB</i>	CLJU_c20600	1-Phosphofruktokinase
	CLJU_c20610	Transkriptionsregulator, DeoR Familie
	CLJU_c26050	Fruktose-spezifisches PTS system, IIB Komponente
	CLJU_c26060	Fruktose-spezifisches PTS system, IIC Komponente
	CLJU_c26070	Fruktose-spezifisches PTS system, IIA Komponente

Die Fruktose-Bisphosphat-Aldolase (CLJU\_c02810), eine weitere 6-Phosphofruktokinase (CLJU\_c25790), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (CLJU\_c13400) und die Schlüsselgene der Gluconeogenese – Fruktose-1,6-Bisphosphatase (CLJU\_c29050), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (CLJU\_c06210) und Pyruvat-Carboxylase (CLJU\_c37390) – liegen ebenfalls einzeln im Genom vor. Weitere Enzyme, die die Umwandlung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat katalysieren, sind die Pyruvat-Phosphat-Dikinase und die Phosphoenolpyruvat-Synthase. Jeweils eine Genkopie davon ist im Genom von *C. ljungdahlii* zu finden (CLJU\_c08140 bzw. CLJU\_c38600).



### 3.1.3.2. Pentose-Phosphat-Weg

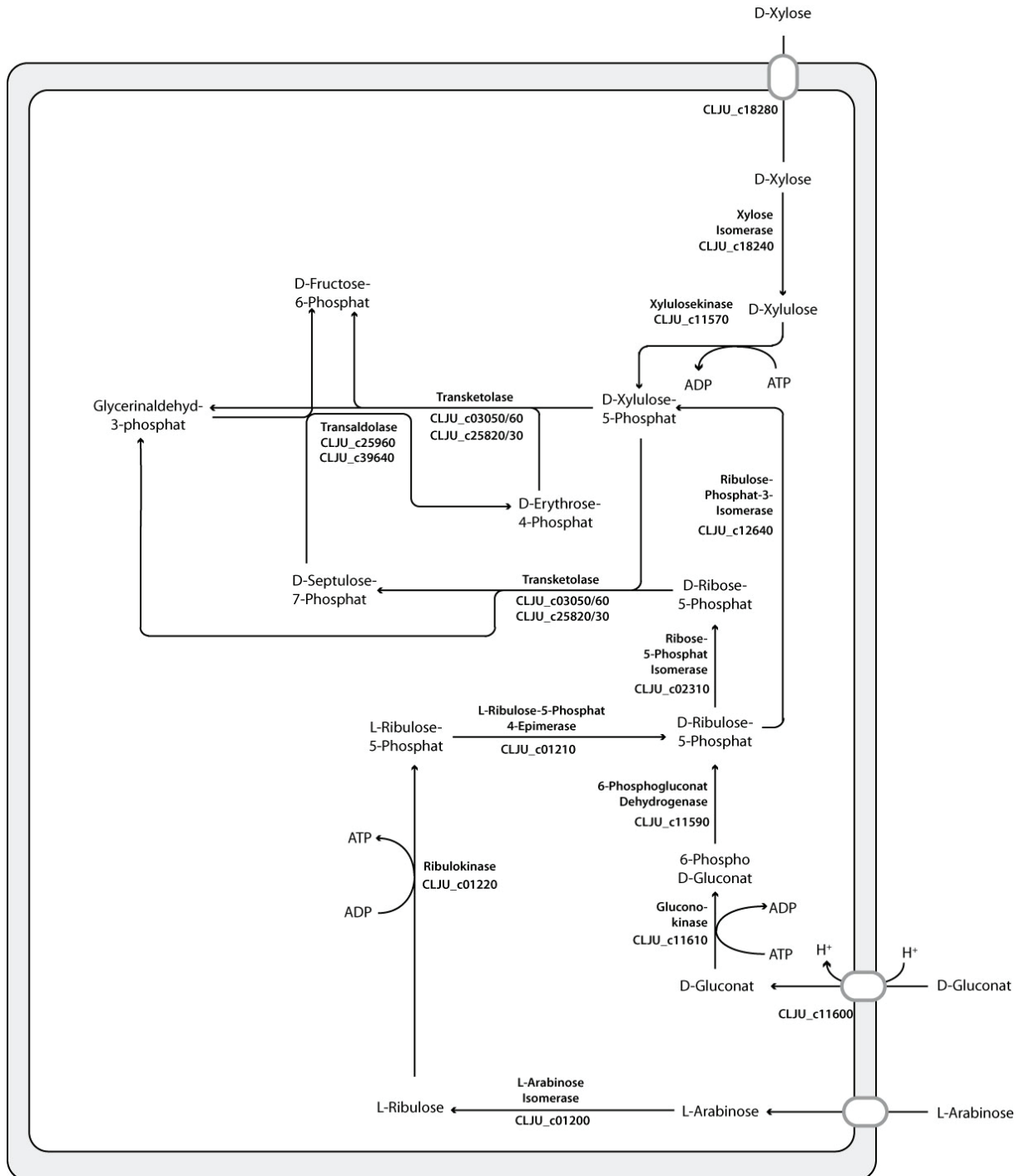
Der Pentose-Phosphat-Weg kann allgemein in zwei Abschnitte unterteilt werden. Im irreversiblen, oxidativen Teil können Hexosen abgebaut und Reduktionsäquivalente (NADPH) generiert werden. Im reversiblen, nicht-oxidativen Teil des Stoffwechselweges werden z. B. Pentosen oder Tetrosen für die Nukleotid oder Aminosäuresynthese synthetisiert. Es können jedoch auch Pentosen mittels Ribulose-5-Phosphat in den Stoffwechsel eingeschleust werden.

Die Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die Glukose-6-Phosphat in 6-Phosphogluconolacton umwandelt. Anschließend wird 6-Phosphogluconolacton von der 6-Phosphoglucono-Lactonase zu 6-Phosphogluconat umgesetzt, das von der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase decarboxyliert und zu Ribulose-5-Phosphat oxidiert wird. Im Genom von *C. ljungdahlii* kann jedoch nur das Gen für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (CLJU\_c11590) gefunden werden. In der Umgebung dieses Gens kann man zwei Gene finden, die für Gluconokinasen oder andere Zucker-Kinasen kodieren (CLJU\_c11570; CLJU\_c11610), ebenso zwei Gene für D-isomer-spezifische 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen (CLJU\_c11580; CLJU\_c11620) und einen hochaffinen Gluconat/H<sup>+</sup>-Symporter (CLJU\_c11600).

Mittels der Produkte dieser Gene könnte Gluconat in den nicht-oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Wegs eingeschleust und umgesetzt werden. Gluconat wird zwar meist über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut, jedoch konnten im Genom weder Gene für eine Phosphogluconat-Dehydratase noch für eine Gluconat-Dehydratase, die jeweils die Schlüsselenzyme des phosphorylierenden bzw. des nicht- oder semiphosphorylierenden Entner-Doudoroff-Wegs sind.

Im nicht-oxidativen Teil werden C<sub>4</sub>-, C<sub>5</sub>-, C<sub>6</sub>- und ein C<sub>7</sub>-Zucker ineinander transformiert. Diese Reaktionen werden von einer Transketolase und einer Transaldolase katalysiert. Im Genom von *C. ljungdahlii* sind jeweils zwei Kopien der Gene für Transketolasen (CLJU\_c03050/60; CLJU\_c25820/30) und Transaldolasen (CLJU\_c25960; CLJU\_c39640) zu finden. Tetrosen und Pentosen werden in der Zelle für die Nukleotidbiosynthese und die Synthese von aromatischen Aminosäuren benötigt. Um diese Produkte aus dem Pentose-Phosphat-Weg zu regenerieren, können Glycerinaldehyd-3-Phosphat und

Fruktose-6-Phosphat aus der Glykolyse oder der Gluconeogenese verstärkt in diesen Kreislauf eingeschleust werden.



**Abb. 11: Schematische Darstellung des Pentose-Phosphat-Wegs in *C. ljungdahlii*;** D-Xylose, L-Arabinose und D-Gluconat können über diesen Stoffwechselweg in die Glykolyse via Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. D-Fruktose-6-Phosphat eingeschleust werden. Ebenso können über diesen Stoffwechselweg Pentosen, Tetrosen und Seduheptulosen synthetisiert werden.

Es wurde gezeigt, dass *C. ljungdahlii* neben Fruktose auch die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose verwerten kann (Tanner *et al.*, 1993). Es lassen sich 2 Cluster im Genom finden (siehe Tab. 10), deren Genprodukte jeweils zum Abbau von D-Xylose bzw. L-Arabinose nötig sind (CLJU\_c18240-80; CLJU\_c01200-20), so dass Produkte entstehen, die in den Pentose-Phosphat-Weg und letztendlich als Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat in die Glykolyse eingeschleust werden (siehe Abb. 11).

**Tab. 10: ORFs und Gennummern der Arabinose- und Xylose-Operon im Genom von *C. ljungdahlii***

ORF	Gennummer	Funktion
<b>Arabinose Operon</b>		
<i>araA</i>	CLJU_c01200	L-Arabinose-Isomerase
<i>araD</i>	CLJU_c01210	L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase
<i>araB</i>	CLJU_c01220	Ribulokinase
<b>Xylose Operon</b>		
<i>xylA</i>	CLJU_c18240	D-Xylose-Isomerase
<i>xylB</i>	CLJU_c18260	D-Xylose-Kinase
	CLJU_c18270	mögliche Aldose-1-Epimerase
<i>xylT</i>	CLJU_c18280	Zuckertransporter
<i>xylR</i>	CLJU_c18290	Transkriptionsregulator

#### Pyruvate:Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Glykolyse führt zur Bildung von Pyruvat. Dies kann von *C. ljungdahlii* mit der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Dabei entstehen Reduktionsäquivalente, die auf Ferredoxin übertragen werden können. Die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase ist in zwei Kopien im Genom vorhanden (CLJU\_c09340, CLJU\_c29340). Daneben kann Pyruvat mittels der Pyruvat:Formiat-Lyase zu Formiat und Acetyl-CoA umgesetzt werden, die in dreifacher Kopie im Genom zu finden ist (CLJU\_c11830, CLJU\_c25980, CLJU\_c39830). Diese Reaktion ist jedoch energetisch ungünstiger, da keine Reduktionsäquivalente gebildet werden.

### Citratzyklus

*C. ljungdahlii* hat wie viele andere anaerobe Mikroorganismen einen verzweigten, unvollständigen Citratzyklus. Es kann mittels einer (Re)-Citrat-Synthase (CLJU\_c06610) aus Acetyl-CoA und Oxalacetat Citrat gebildet werden. Die (Re)-Citrat-Synthase ist in einem Operon mit einer Aconitase (CLJU\_c06620) und einer NAD-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase (CLJU\_c06630), die die nachfolgenden Schritte über Isocitrat zu 2-Ketoglutarat katalysieren. 2-Ketoglutarat ist ein wichtiges Intermediat für die Biosynthese verschiedener Aminosäuren. Citrat kann jedoch auch von einem Citrat-Lyase-Komplex (CLJU\_c25320-50; CLJU\_c30470-90; CLJU\_c40550-80) wieder in Acetat und Oxalacetat gespalten werden.

Auf der anderen Seite können Fumerat und Malat in den Citratzyklus eingeschleust werden und mittels einer Malat-Dehydrogenase (CLJU\_c05920) und einer Fumerat-Hydratase (CLJU\_c40590-600) in Oxalacetat umgewandelt werden.

#### 3.1.4. Bioenergetik

*C. ljungdahlii* kann Energie auf zwei verschiedene Arten gewinnen. Während des heterotrophen Wachstums kann ATP durch Substratketten-Phosphorylierung gewonnen werden. Während des autotrophen Wachstums ist dies jedoch nicht möglich, da zwar ein ATP produziert, dies jedoch im Verlauf des Wood-Ljungdahl-Wegs auch wieder verbraucht wird. Unter autotrophen Bedingungen wird Energie über einen chemiosmotischen Ionengradienten generiert. Dafür wurden bisher zwei unterschiedliche Typen beschrieben.

Organismen wie *A. woodii* etablieren einen Natriumgradienten über einen Rnf-Komplex (Biegel & Müller, 2010; Biegel *et al.*, 2011; Biegel *et al.*, 2009). Die andere Gruppe mit *M. thermoacetica* besitzen Cytochrome und Quinone mit deren Hilfe sie einen Protonengradienten aufbauen (Das & Ljungdahl, 1997).

### 3.1.4.1. Rnf-Komplex

Obwohl *C. ljungdahlii* - wie *M. thermoacetica* - einen  $H^+$ -Gradienten aufbaut und Natrium-unabhängig wachsen kann (Köpke *et al.*, 2010), finden sich im Genom keine Gene für Cytochrom- oder Quinonhaltige Enzyme. Jedoch kann man ein Cluster von 6 Genen identifizieren, die für eine membrangebundene ionentranslozierende Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (Rnf-Komplex) kodieren können. Diese katalysiert einen energieabhängigen Transport von Ionen über die Zellmembran durch die Übertragung von Elektronen von reduziertem Ferredoxin auf NAD<sup>+</sup> (Biegel *et al.*, 2011). Die Gene und auch die Organisation sind denen von *A. woodii* sehr ähnlich. Bei diesem Organismus wurde der Rnf-Komplex biochemisch untersucht und gezeigt, dass ein Transport von Ionen über die Membran durch einen Elektronentransfer von Ferredoxin auf NAD<sup>+</sup> stattfindet (Biegel & Müller, 2010). Die Genorganisation ist *rnfCDGEAB* (CLJU\_c11360-410). Des Weiteren befindet sich stromaufwärts der *rnf*-Gene ein Gen, das vermutlich für einen positiven Regulator kodiert. Ähnliche Gene vor dem *rnf*-Cluster finden sich nur noch in *C. carboxidivorans* (CLCAR\_2062), *C. beijerinckii* (Cbei\_2448), *Desulfitobacterium metallireducens* (DesmeDRAFT\_2664) und *Thermosinus carboxidivorans* (TcarDRAFT\_1673).

### 3.1.4.2. Etf-Gene

In anaeroben Bakterien wurde vor kurzem entdeckt, dass bei der Reduktion von Crotonyl-CoA mit NADH zu Butyryl-CoA zusätzlich Elektronen auf Ferredoxin übertragen werden. Dabei spielen neben der Butyryl-CoA Reduktase auch die beiden Flavoproteine EtfAB eine wichtige Rolle. Dabei wird eine energetisch ungünstige, endergone Reaktion (Reduktion von Ferredoxin) durch eine gekoppelte, exergone Reaktion (Reduktion von Crotonyl-CoA) angetrieben. Diese Art der Energiekonservierung bezeichnet man als *electron bifurcation*. In *A. woodii* wurde bei der Caffeyl-CoA Reduktion auch eine Beteiligung von EtfAB festgestellt (Imkamp *et al.*, 2007).

Im Genom von *C. ljungdahlii* findet man Gene für 5 *etfAB*-Paare. Drei dieser Genpaare sind mit einer FMN/FAD-enthaltenden Dehydrogenase (CLJU\_c21570-90; CLJU\_c13880-900; CLJU\_c20330-50) assoziiert, deren Funktion nicht bekannt ist. Ein weiteres *etfAB*-Paar ist zusammen mit einer möglichen Acyl-CoA-Dehydrogenase und -Transferase (CLJU\_c39400-10) lokalisiert, die evtl. eine Rolle beim Fettsäurestoffwechsel innehaben. Das

fünfte *etfAB*-Paar liegt in einem Cluster mit *fixC*, einer FAD-abhängigen Dehydrogenase (CLJU\_c40210) und einem *fixX*-ähnlichem Gen (CLJU\_c40200), das für ein Ferredoxin-ähnlichen Protein kodiert. Untersuchungen von FixABCX in *Rhodospirillum rubrum* und *Rhizobium meliloti* zeigen, dass die Gene für einen möglichen membrangebundenen Proteinkomplex kodieren und in diesen Organismen vermutlich den Elektronentransfer zur Nitrogenase katalysieren (Earl *et al.*, 1987; Edgren & Nordlund, 2004).

### 3.1.4.3. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Typ-ATPase

ATP kann neben der Substratkettenphosphorylierung auch über eine ATP-Synthase gebildet werden. Dabei wird die Bildung von ATP an einen Ionengradienten über die Zellmembran gekoppelt. Durch den energetisch günstigen Ionen-transport wird die Energie zur ATP-Bildung bereitgestellt. Die Spezifität einer ATPase kann man aufgrund eines Na<sup>+</sup>-Bindemotivs in der Aminosäuresequenz der C-Untereinheit (*atpE*) mit großer Wahrscheinlichkeit bestimmen (Meier *et al.*, 2006).

*C. ljungdahlii* besitzt eine F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Typ ATPase (CLJU\_c02360 – CLJU\_c02440), die ATP mit Hilfe eines Protonengradienten bildet, da das Na<sup>+</sup>-Bindemotiv in der Proteinsequenz fehlt. Des Weiteren findet man vor dem ATPase-Operon das Gen *atpI*, eine weitere kleine Untereinheit mit 121 AS, das für ein Membranprotein mit mehreren vorhergesagten Transmembrandomänen kodiert. Die Sequenz dieses Gen unterscheidet sich von den *atpI*-Genen bei *E. coli* oder *B. subtilis*, jedoch scheinen alle Gene für Membranproteine mit mehreren Transmembrandomänen zu kodieren.

### 3.1.5. Stickstoffmetabolismus

Für die Assimilation von Stickstoff oder Stickstoffverbindungen hat *C. ljungdahlii* anhand der Genomdaten unterschiedliche Möglichkeiten. Von den Genomdaten abgeleitet, kann der Organismus sowohl molekularen Stickstoff mittels einer Molybdän-abhängigen Nitrogenase (CLJU\_c04930-50) als N-Quelle nutzen, als auch Ammoniumionen oder Nitrat.

Ammonium kann über zwei verschiedene Reaktionen direkt in Aminosäuren (Glutamin und Glutaminsäure) eingebaut werden. Einerseits kann mittels einer Glutamatdehydrogenase (CLJU\_c02660) 2-Oxoglutarat und NADPH zu L-Glutamat, NADP<sup>+</sup> und H<sub>2</sub>O reagieren.



Alternativ dazu kann Ammonium auch über eine Glutamat-Ammonium-Ligase (CLJU\_c41950) und eine Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase (CLJU\_c17370-80) assimiliert werden.

Zusätzlich kann man im Genom ein Cluster von drei Genen (CLJU\_c23710-30) finden, die eine sehr große Ähnlichkeit zu den Genen einer Nitratreduktase in *C. perfringens* haben. Sie besteht aus einer katalytischen Untereinheit, einem FeS-Protein und einer NADH-Oxidase.

Diese Nitratreduktase wurde bisher nur in *C. perfringens* gefunden und wurde dort auch genauer untersucht (Chiba & Ishimoto, 1973). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Reduktase bei Anwesenheit von Rubredoxin eine NAD(P)H-abhängige Nitratreduktion katalysiert (Seki *et al.*, 1989). Der Enzymkomplex unterscheidet sich von assimilatorischen als auch von respiratorischen Nitratreduktasen und scheint weniger der Nitratassimilation als der Energiegewinnung zu dienen. Diese Art der Nitratreduktion wird auch als Nitratfermentation bezeichnet (Fujinaga *et al.*, 1999).

### 3.1.6. Vitaminbiosynthese

*C. ljungdahlii* hat viele Gene, die für Cobalamin-abhängige Proteine kodieren. Die Vorstufe von Tetrapyrrol – 5-Amino-Levulinat – wird von den Enzymen Glutamyl-tRNA-Synthase (CLJU\_c13390), Glutamyl-tRNA-Reduktase (CLJU\_c04480) und Glutamat-1-Semialdehyd-1,2-Amino-Mutase (CLJU\_c04490) aus L-Glutamat synthetisiert. Im Genom lässt sich für die Gene der Tetrapyrrol-Biosynthese ein großes Gencluster finden (CLJU\_c31820-32020), das in vielen Clostridien konserviert zu sein scheint. Jedoch konnten keine Gene identifiziert werden, die Homologien zu Genen in *M. thermoacetica* aufweisen, die Cytochrome als Cofaktoren enthalten, z. B. eine Cytochrom-*bd*-Ubiquinol-Oxidase (Moth2095-8, enthält Cytochrom *b<sub>559</sub>*) oder eine Untereinheit einer Formiat-Dehydrogenase (Moth\_0452, enthält Cytochrome *b<sub>554</sub>*).

Weitere Cofaktoren die *C. ljungdahlii* anhand der Genomdaten synthetisieren kann, sind Folsäure, Riboflavin, NAD<sup>+</sup>, CoA, Thiamin und Cobalamin. Obwohl Biotin für einige Reaktionen benötigt wird (z. B. Biotin-Carboxylase in der Fettsäure-Biosynthese), fehlen Gene zur Biosynthese, so dass Biotin vermutlich aufgenommen werden muss. Eine Liste der Gene befindet sich im Anhang (siehe Tab. 48).

### 3.1.7. Ethanolproduktion und –verbrauch

Im Genom von *C. ljungdahlii* findet man mehrere Systeme um Ethanol entweder zu produzieren oder auch zu verbrauchen. Verwertung und Produktion von Ethanol geschieht meist über Acetyl-CoA und Acetaldehyd durch Alkoholdehydrogenasen und Acetaldehyddehydrogenasen. Es lassen sich im Genom mehrere Gene finden, die für Alkoholdehydrogenasen und Aldehyddehydrogenasen kodieren. Dabei fallen zwei Gene mit hoher Ähnlichkeit zueinander auf, die direkt nebeneinander auf dem Genom lokalisiert sind und für bifunktionale Acetaldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase *adhE* (CLJU\_c16510-20) kodieren. Eine weitere Alkohol-Dehydrogenase (CLJU\_c11880) und Acetaldehyd-Dehydrogenase (CLJU\_c11960) sind in einem Cluster von 15 Genen zu finden, in dem u. a. auch fünf Gene für Mikrokompartmentproteine und Homologe zu Genen, die in *Salmonella typhimurium* in Verbindung zu Ethanolaminverwertung stehen (Kofoid *et al.*, 1999), lokalisiert sind. Daneben findet man noch weitere Fe- oder Zn-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen, die zusammen mit den identifizierten Aldehyd-verwertenden Enzymen in Tab. 11 zusammengefasst sind. Bei einem Vergleich der Alkohol-Dehydrogenasen mit der Swiss-Prot-Datenbank zeigte sich, dass drei Enzyme eine hohe Ähnlichkeit zum *bdh1*-Gen aus *C. acetobutylicum* aufwiesen, das von Youngleson (1989) charakterisiert wurde.

Neben den Aldehyd-Dehydrogenasen (CLJU\_c11960, CLJU\_c39730 und CLJU\_c39840) besitzt *C. ljungdahlii* noch jeweils zwei Gene, die für Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktasen (AOR) (CLJU\_c20110 und CLJU\_c20210) und Aldehyd-Oxidoreduktasen (CLJU\_c24050 und CLJU\_c24130) kodieren. Die beiden Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktasen sind zueinander sehr ähnlich und besitzen bei einem Vergleich mit der Swiss-Prot-Datenbank die größte Ähnlichkeit zu archaeellen AORs aus Thermococcales-Arten (z.B. *Pyrococcus furiosus* DSM 3638, *Thermococcus kodakarensis* KOD1). Die beiden Aldehyd-Oxidoreduktasen weisen die größte Ähnlichkeit zu einer Aldehyd-Oxidoreduktase von *Desulfovibrio giga* auf (Thoenes *et al.*, 1994), die zur gleichen Enzymfamilie wie die Xanthin-Dehydrogenase gehört. Diese Enzyme sind Homodimere und besitzen Molybdän als Kofaktor und beinhalten zwei 2Fe-2S-Cluster (Barata *et al.*, 1992). In Experimenten konnten DCPIP und Ferricyanid als artifizielle Elektronenakzeptoren identifiziert werden (Barata *et al.*, 1993).

**Tab. 11: Alkoholdehydrogenasen und Enzyme des Aldehyd-Metabolismus, die im Genom von *C. ljungdahlii* identifiziert werden konnten.**

ORF	Gennummer	Mögliche Funktion/Ähnlichkeiten
<b>Alkohol-Dehydrogenasen</b>		
	CLJU_c11880	NAD(P)-abhängige Fe-haltige Alkohol-Dehydrogenase
<i>adhE1</i>	CLJU_c16510	Bifunktionale Alkohol-/Aldehyd-Dehydrogenase
<i>adhE2</i>	CLJU_c16520	Bifunktionale Alkohol-/Aldehyd-Dehydrogenase
	CLJU_c19540	Alkohol-Dehydrogenase-Superfamily, Zink-haltig
	CLJU_c23220	Alkohol-Dehydrogenase-Superfamily, Zink-haltig
	CLJU_c23460	NAD-abhängige Fe-haltige Alkohol-Dehydrogenase
	CLJU_c24860	NAD(P)-abhängige, zink-haltige Alkohol-Dehydrogenase
<i>adh1</i>	CLJU_c24880	NAD(P)-abhängige, Fe-haltige Alkohol-Dehydrogenase
	CLJU_c25810	Alkohol-Dehydrogenase-Superfamily, Zink-haltig
	CLJU_c25840	Alkohol-Dehydrogenase-Superfamily, Zink-haltig
	CLJU_c29830	Dehydrogenase, verwandt mit short-chain Alkohol-Dehydrogenase
	CLJU_c38580	Zink-haltige Alkohol-Dehydrogenase Gruppe III,
	CLJU_c39670	NAD(P)-abhängige Fe-haltige Alkohol-Dehydrogenase
<i>adh2</i>	CLJU_c39950	NAD(P)-abhängige Fe-haltige Alkohol-Dehydrogenase
<b>Aldehyd-verwertende Enzyme</b>		
	CLJU_c11960	Acetaldehyd-Dehydrogenase
	CLJU_c39730	Acetaldehyd-Dehydrogenase
	CLJU_c39840	Acetaldehyd-Dehydrogenase
	CLJU_c20110	W-abhängige Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase
	CLJU_c20210	W-abhängige Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase
	CLJU_c24050	Mo-abhängige Aldehyd-Oxidoreduktase
	CLJU_c24130	Mo-abhängige Aldehyd-Oxidoreduktase

### 3.1.8. Glycin- und Betainabbau

Im Genom findet man Gene für zwei verschiedene Systeme, die *C. ljungdahlii* dazu befähigen, Glycin oder Derivate davon zu verwerten. Man findet einerseits eine Glycin-Dehydrogenase (*glycine cleavage system*), deren Komponenten *gcvPA*, *gcvPB*, *gcvT* und *gcvH* in einem Cluster von vier Genen kodiert sind (CLJU\_c24150-80). Ein weiteres Gen für das Carrierprotein *GcvH* und für eine Dihydrolipoamid-Dehydrogenase sind in einem Cluster zusammen mit den Genen des Wood-Ljungdahl-Wegs organisiert (siehe 3.1.2.1). Die Glycin-Dehydrogenase ist abhängig von Pyridoxal-Phosphat und Folat und spaltet Glycin in CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> und 5,10-Methylene-THF (Andreesen, 1994; Kazuko Okamura-Ikeda *et al.*, 1993). CO<sub>2</sub> und 5,10-Methylene-THF können in den Wood-Ljungdahl-Weg eingeschleust werden.

Außerdem besitzt *C. ljungdahlii* zwei Gencluster, die jeweils für eine Betain-Reduktase kodieren (CLJU\_c2729-360; CLJU\_c27770-840). Die Gene weisen jeweils eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf und auch die Genorganisation ist bei beiden Clustern identisch (siehe Abb. 12 und Tab. 12). In die Cluster sind jeweils Gene für ein Thioredoxin-System bestehend aus einer Thioredoxin-Reduktase und einem Thioredoxin und einen Betain-spezifischen Transporter integriert.

Dieser Enzymkomplex besteht aus fünf Genen, deren Produkte in drei funktionale Einheiten unterteilt werden können (Andreesen, 2004). Die funktionale Untereinheit P<sub>B</sub> wird von zwei Genen kodiert, eines davon Selenocystein-haltig. Diese Komponente ist verantwortlich für die Spezifität der Reduktase und die Aktivierung des Substrats (Meyer *et al.*, 1995). Die Untereinheit P<sub>A</sub> ist ein redox-aktives Selenoprotein, das durch Carboxymethylierung des Selenocysteins einen Selenoether bildet und diesen als Acetyl-Thioester auf die Komponente P<sub>C</sub> transferiert. Dabei wird das Selen im aktiven Zentrum oxidiert und anschließend durch ein Thioredoxin-System wieder regeneriert. Die funktionale Untereinheit P<sub>C</sub> besteht aus zwei Proteinen, die den Acetylerster bindet und anschließend als Acetylphosphat entlässt (Andreesen, 1994, 2004; Arkowitz & Abeles, 1991; Meyer *et al.*, 1995).

Die drei Reduktasen zum Abbau von Glycin, Sarcosin und Betain zeigen zueinander eine hohe Ähnlichkeit, wobei die Spezifität jeweils durch die Proteinsequenz der Untereinheit P<sub>B</sub> bestimmt werden kann (Meyer *et al.*, 1995).



**Abb. 12: Organisation der zwei Gencluster, die für Betainreduktasen kodieren mit umliegenden Genen.** Gennummern und Funktionen sind in Tab. 12 dargestellt.

**Tab. 12: ORF, Gennummer und mögliche Funktion der Untereinheiten der Betainreduktasen und der benachbarten ORFs.** Die Anordnung der Gene ist in Abb. 12 dargestellt.

ORF	Gennummer	Funktion/Annotation
	CLJU_c27740	Transkriptionsregulator, LysR Familie
	CLJU_c27750	Protein mit unbekannter Funktion
	CLJU_c27760	Protein mit unbekannter Funktion
<i>grdD</i>	CLJU_c27770	Betainreduktase Untereinheit C $\alpha$
<i>grdC</i>	CLJU_c27780	Betainreduktase Untereinheit C $\beta$
<i>grdA</i>	CLJU_c27790	Betainreduktase Untereinheit A2
<i>trxA</i>	CLJU_c27800	Thioredoxin
<i>trxB</i>	CLJU_c27810	Thioredoxinreduktase
	CLJU_c27820	Cholin/Carnitin/Betain Transporterprotein
<i>grdB</i>	CLJU_c27830	Betainreduktase Untereinheit B $\gamma$
<i>grdE</i>	CLJU_c27840	Betainreduktase Untereinheit B $\alpha$
	CLJU_c27850	Transkriptionsregulator BetI-ähnlich
<i>grdD</i>	CLJU_c27290	Betainreduktase Untereinheit C $\alpha$
<i>grdC</i>	CLJU_c27300	Betainreduktase Untereinheit C $\beta$
<i>grdA</i>	CLJU_c27310	Betainreduktase Untereinheit A2
<i>trxA</i>	CLJU_c27320	Thioredoxin
<i>trxB</i>	CLJU_c27330	Thioredoxinreduktase
	CLJU_c27340	Cholin/Carnitin/Betain Transporterprotein
<i>grdB</i>	CLJU_c27350	Betainreduktase Untereinheit B $\gamma$
<i>grdE</i>	CLJU_c27360	Betainreduktase Untereinheit B $\alpha$
	CLJU_c27370	hypothetisches Protein

### 3.1.9. Selenocysteinbiosynthese

Im Genom von *C. ljungdahlii* sind einige Gene vorhanden, die für Selenoproteine kodieren, z.B. Formiatdehydrogenasen oder Untereinheiten der Betainreduktasen. Um Selenocystein zu synthetisieren, sind vier Gene nötig: *selC*, das für eine Selenocystein-spezifische tRNA kodiert, eine Selenocystein-Synthase (*selA*), eine Selenophosphat-Synthetase (*selD*) und ein spezieller Elongationsfaktor (*selB*), der die Selenocystein-tRNA und eine spezifische Sekundärstruktur der mRNA (SECIS: *Selenocysteine insertion sequence*) bindet (Heider & Böck, 1993). Im Genom findet man zwei Selenocystein-spezifische tRNAs (CLJU\_c27280 und CLJU\_c27690), beide direkt bei bzw. in der Nähe der beiden Betain-Reduktasen. Die anderen Gene zur Synthese von Selenocystein sind jeweils auch zweifach vorhanden (CLJU\_c07460-80; CLJU\_c2770-20). Ein Cluster (CLJU\_c27700-20) befindet sich ebenfalls in der Nähe einer Betain-Reduktase, zusammen mit einer möglichen Selenocystein-Lyase (CLJU\_c27730), die Selenocystein in Selenid und Alanin spalten kann (Esaki *et al.*, 1982).



**Abb. 13: Organisation der beiden Gencluster, die für Proteine der Selenocysteinbiosynthese kodieren**

**Tab. 13: ORF, Gennummer und Funktion der Gene für die Selenocysteinbiosynthesecluster.** Die Anordnung der Gene ist in Abb. 13 dargestellt

ORF	Gennummer	Funktion/Annotation
tRNA-Sec	CLJU_c27690	tRNA spezifisch für Selenocystein
<i>selB</i>	CLJU_c27700	Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor
<i>selA</i>	CLJU_c27710	Selenocystein-Synthase
<i>selD</i>	CLJU_c27720	Selenophosphat-Synthetase
	CLJU_c27730	Selenocystein-Lyase
<i>selD</i>	CLJU_c07460	Selenophosphat-Synthetase
<i>selA</i>	CLJU_c07470	Selenocystein-Synthase
<i>selB</i>	CLJU_c07480	Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor

### 3.1.10. O-Demethylierungssysteme und Cobalamin-abhängige Methyltransferasen

Für andere untersuchte homoacetogene Organismen wie *M. thermoacetica* oder *A. woodii* ist es charakteristisch, dass sie Methylgruppen verstoffwechseln können, die von einer großen Anzahl verschiedener methoxylierter Phenylacrylaten stammen können. Das O-Demethylierungssystem in *M. thermoacetica* soll eine breite Substratspezifität haben und mindestens 20 verschiedene methoxylierte, aromatische Verbindungen verstoffwechseln können (Daniel *et al.*, 1991). Ähnlich zu anderen Homoacetogenen besitzt *C. ljungdahlii* mehrere enzymatische Systeme mit Homologen zu Genen, die bei *M. thermoacetica* an Demethylierungsreaktionen von methoxylierten Phenylacrylaten beteiligt sind (Pierce E., 2008). Diese Systeme sind modular aufgebaut und bestehen meist aus den drei Proteinen MtvA, MtvB und MtvC (siehe Abb. 14). Im Genom kann man fünf Homologe zu *mtvB* finden, deren Produkte die Demethylierungsreaktion katalysiert. Vier davon sind mit Homologen von *mtvC* und *mtvA* geclustert. MtvC ist ein Corrinoide-Protein, von dem die

Methylgruppe von MtvA, einer Methylcobalamin:THF-Methyltransferase auf THF übertragen wird. Im Genom sind acht ORFs, die für Homologe von *mtvC* und 16 Gene, die für Homologe von *mtvA* kodieren, zu finden. Die meisten dieser Gene sind bei *C. ljungdahlii* mit zumindest einem der beiden anderen Bestandteile dieses Demethylierungssystems im Genom lokalisiert.

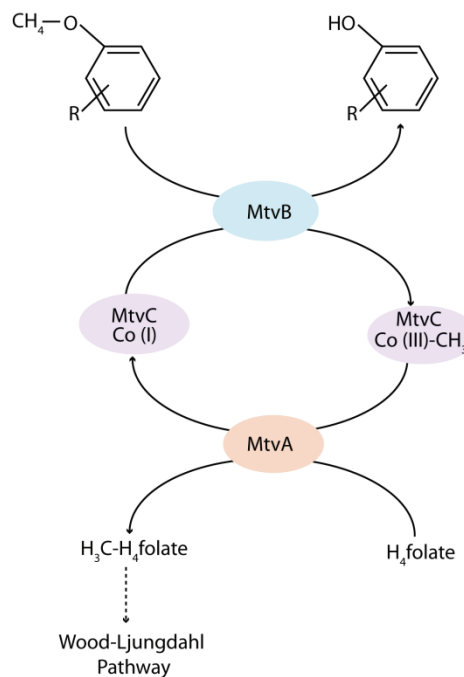


Abb. 14: Schematische Darstellung des O-Demethylierungssystems

### 3.2. Wachstumsversuche

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Grundlage der Genomdaten das Wachstum von *C. ljungdahlii* mit verschiedenen C- und N-Quellen getestet. Dafür wurde der Organismus in PETC-Medium mit jeweils 50 mM des Substrats kultiviert (getestete C-Quellen siehe Tab. 14). Um falschpositive Ergebnisse zu vermeiden, wurde erst, wenn auf dem jeweiligen Substrat auch in der zweiten Passage Wachstum zu beobachten war, angenommen, dass *C. ljungdahlii* dies auch verwerten konnte.

**Tab. 14: Wachstum von *C. ljungdahlii* auf verschiedenen Substraten oder Substratkombinationen; +: deutliches Wachstum auch in der 2. Passage; -: kein Wachstum**

Substrat C-Quelle	Wachstum	Substrat C-Quelle	Wachstum
H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (50:50)	+	L-Prolin	-
		L-Alanin + Glycin	-
D-Fruktose	+	L-Alanin + L-Prolin	-
D-Glukose	+ <sup>a</sup>	Betain + L-Alanin	-
L-Arabinose	+	Glycin + L-Alanin	-
D-Xylose	+	Harnsäure	-
D-Gluconat	+	Xanthin	-
Citrat	-	Glycin + Ethanol	-
Ethanol	-	Sarcosin + Ethanol	-
Glycin	-	Betain + Ethanol	+
Sarcosin	-	Betain + Citrat	-
Betain	-	Harnsäure + Ethanol	- <sup>b</sup>
L-Glutamat	+	Adenosin	-
L-Alanin	-	Guanosin	-

<sup>a</sup> nach Adaptionszeit

<sup>b</sup> Kein Wachstum, aber Sporenbildung

Ebenso wurde mit den Versuchen zu verschiedenen N-Quellen verfahren, mit dem Unterschied, dass hier jeweils 19 mM der Substanzen zugegeben wurden, analog zur Menge an Ammonium im Originalmedium (siehe Tab. 15). Als C-Quelle wurde meist 50 mM Fruktose zugegeben. Das Wachstum mit Nitrat als N-Quelle wurde jedoch zusätzlich unter autotrophen Bedingungen mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) als C-Quelle getestet (siehe 3.2.6).

**Tab. 15. Wachstum von *C. ljungdahlii* auf verschiedenen N-Quellen; +: deutliches Wachstum auch in der 2. Passage; -: kein Wachstum**

Substrat C-Quelle	Wachstum
Ammonium	+
Nitrat	+
Harnsäure	+
Xanthin	-
Adenosin	-
Guanosin	-

Um einen Einblick in den Stoffwechsel des Organismus auf verschiedenen Substraten zu bekommen, wurde auf Basis der Genomsequenz und der Annotation ein Oligo-basierter DNA-Microarray konstruiert, mit dessen Hilfe die Genexpression untersucht werden kann.

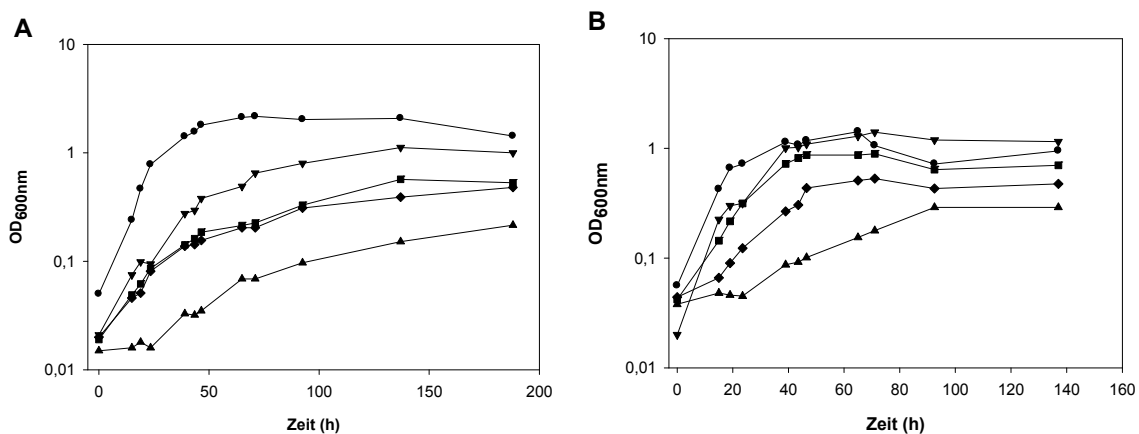


Von den Substraten, die *C. ljungdahlii* verwerten kann, wurden einige ausgewählt und das Wachstum darauf näher untersucht. Es wurden Transkriptionsanalysen während des exponentiellen Wachstums durchgeführt, um die Genexpression bei Wachstum auf verschiedenen C-Quellen zu untersuchen. Wenn möglich, wurden außerdem der Verbrauch der Substrate und die Bildung von potentiellen Fermentationsprodukten mittels Ionenchromatographie analysiert.

Außerdem wurde das Wachstum auf verschiedenen Medien und die Toleranz von *C. ljungdahlii* gegenüber Ethanol untersucht.

### 3.2.1. Wachstumsverhalten von *C. ljungdahlii* bei steigenden Ethanolkonzentrationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Toleranz von *C. ljungdahlii* gegenüber steigenden Konzentrationen von Ethanol untersucht. Dabei wurde der Organismus in 60 mL PETC-Medium mit zwei verschiedenen Substraten und unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen von 50 mM bis 1,5 M kultiviert. Einerseits wurden 50 mM Fruktose als alleinige C-Quelle, andererseits 100 mM Betain mit Ethanol als Co-Substrat (siehe Abb. 15).

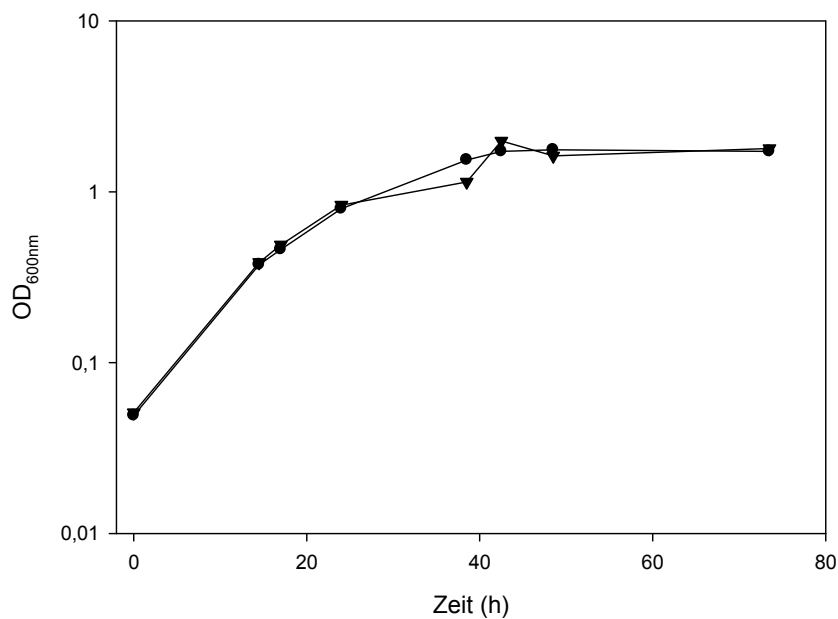


**Abb. 15: Wachstum von *C. ljungdahlii* mit verschiedenen Konzentrationen von Ethanol; A:** Wachstum von *C. ljungdahlii* mit Fruktose in Anwesenheit von 0 M Ethanol (●), 0,4 M Ethanol (▼), 0,7 M Ethanol (■), 0,8 M Ethanol (◆) bzw. 1,0 M Ethanol (▲); **B:** Wachstum von *C. ljungdahlii* mit Betain in Anwesenheit von 0,1 M Ethanol (●), 0,4 M Ethanol (▼), 0,9 M Ethanol (■), 1,1 M Ethanol (◆) bzw. 1,2 M Ethanol (▲). Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Graphen zeigen repräsentative Einzelmessungen.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass bei Wachstum auf Fruktose ein vermindertes Wachstum bei einer Ethanolkonzentration von 0,6 M (= 3,50%) und kein Wachstum mehr bei einer Konzentration von 1,1 M (= 6,41%) zu beobachten war. Bei Kultivierung mit Betain war mit einer kleineren maximalen OD<sub>600</sub> ab einer Konzentration von 1,0 M (= 5,83%) und keinem Wachstum ab 1,3 M (= 7,58%) Ethanol eine höhere Resistenz zu beobachten. Dies konnte jedoch nicht auf einen hohen Verbrauch von Ethanol zurückgeführt werden, da bei Messungen der Ethanolmenge im Kulturüberstand von *C. ljungdahlii* mittels GC auch bei hohen initialen Ethanolmengen nur ein Verbrauch von ca. 50 mM Ethanol zu messen war (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.2.2. Wachstum von *C. ljungdahlii* in Natrium-freien Medium

Homoacetogene werden in Bezug auf ihren Energiestoffwechsel in zwei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe mit *A. woodii* als Beispielorganismus besitzt einen Rnf-Komplex und bildet ein elektrochemisches Potential auf Basis von Na<sup>+</sup> aus, bei der anderen Gruppe mit *M. thermoacetica* wurden Cytochrome in der Membran identifiziert und es wird ein Protonengradient aufgebaut. Da *C. ljungdahlii* mit großer Wahrscheinlichkeit eine H<sup>+</sup>-abhängige ATP-Synthase besitzt (siehe 3.1.4.3), wurde getestet, ob der Organismus in Medium ohne Natrium wachsen kann. Dafür wurden im PETC-Basalmedium alle Natrium-Komponenten gegen äquivalente Verbindungen mit Kalium ausgetauscht. In der Spurenelementlösung ist zwar Natrium enthalten, die Menge liegt jedoch im Bereich von µg (ca. 0,24 µM) und kann vernachlässigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Fruktose als C-Quelle zugegeben.



**Abb. 16: Wachstum von *C. ljungdahlii* mit Natrium (●) und ohne Natrium (▼) im Medium.** Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Abbildung zeigt eine repräsentative Einzelmessung.

Wie aus Abb. 16 zu entnehmen ist, kann bei heterotrophen Wachstum auf Fruktose kein Unterschied beim Wachstumsverhalten von Zellen beobachtet werden, die mit bzw. ohne Natrium kultiviert wurden. Weiterführende Experimente zum autotrophen Wachstum unter  $\text{Na}^+$ -limitierenden Bedingungen wurden daraufhin von Michael Köpke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dürre durchgeführt.

### 3.2.3. Referenzbedingung bei Transkriptionsanalysen

Für Transkriptionsanalysen wurden – wenn nicht anders angegeben – auf Fruktose kultivierte Zellen als Standardbedingung zum Vergleich der Genexpression genutzt. Das Wachstum auf Fruktose ist einerseits sehr gut reproduzierbar. Andererseits wächst *C. ljungdahlii* auf diesem Substrat in vergleichsweise kurzer Zeit zu einer relativ hohen  $\text{OD}_{600}$  von bis zu 2,0 – 2,2, so dass man Zellen der exponentiellen Wachstumsphase bei  $\text{OD}_{600}$  von ca. 0,3 – 0,5 ernten kann.

### 3.2.4. Autotrophes Wachstum

*C. ljungdahlii* wurde aufgrund seiner Fähigkeit isoliert, Ethanol aus Synthesegas – einem Gemisch aus CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> – zu produzieren. Das Hauptfermentationsprodukt des homoacetogenen Organismus ist jedoch Essigsäure. Bei Untersuchungen zeigte sich, dass *C. ljungdahlii* während des Wachstums auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> weniger Ethanol produziert, wohingegen während des Wachstums auf Synthesegas oder auch auf Fruktose mehr Ethanol produziert wird (Köpke, 2009b). Deshalb wurde *C. ljungdahlii* auf Fruktose bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) angezogen und Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet um RNA zu isolieren und damit Transkriptionsanalysen durchzuführen.

Um *C. ljungdahlii* auf einem H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasgemisch (50%/50% (v/v)) zu kultivieren, musste der Organismus erst auf das autotrophe Wachstum adaptiert werden. So haben Kulturen, die zuvor bereits autotroph kultiviert wurden eine kürzere Lag-Phase und erreichen höhere Zelldichten, als Kulturen, die zuvor heterotroph auf Fruktose gewachsen waren. Die Anzucht erfolgte in 1000 mL-Glasflaschen mit 120 mL Medium und 1bar Überdruck in der Gasphase. Maximal wurde eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,3-0,4 während des Wachstums auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) erreicht. Für Transkriptionsanalysen wurden immer Zellen der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> = 0,1) von bereits adaptierten Kulturen geerntet.

Zusätzlich wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Dürre *C. ljungdahlii* mit Synthesegas als Substrat von Michael Köpke kultiviert und Zellen während der exponentiellen (OD<sub>600</sub> = 0,3) geerntet. Davon wurde auch RNA isoliert und für DNA-Microarray-Analysen gelabelt. Aufgrund der unterschiedlichen Mengenverhältnisse der Produkte wurden die Genexpressionen von Zellen, die auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) bzw. Synthesegas angezogen wurden einerseits mit der Genexpression von auf Fruktose gewachsenen Zellen verglichen, andererseits auch miteinander verglichen.

Da *C. ljungdahlii* v. a. auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) nur auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,3 wächst und bei OD<sub>600</sub> in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurde, war es einerseits mühsam, genügend Zellmasse aus einer Kultur zu gewinnen. Andererseits zeigte sich, dass bei den RNA-Proben von autotroph gewachsenen Kulturen – trotz guter RNA-Qualität und guten Farbstoffeinbaus – der Hintergrund der Slides beim Scannen immer höher war, als bei der Vergleichsprobe aus Zellen gewachsen auf Fruktose. Auch waren die Signale der Spots schwächer, so dass die Qualität der DNA-Microarray-Experimente schlechter war. Deshalb wurde der Wert der „Abweichung der Ratios“ auf 50% hochgesetzt, so dass mehr Gene über

die Qualitätsparameter validiert werden konnten. Außerdem wurden alle Daten manuell nochmals überprüft, um auch solche Gene zu erfassen, die nur in einem der beiden verglichenen Zustände ein signifikantes Signal zeigten.

#### 3.2.4.1. Transkriptionsanalysen des autotrophen Wachstums auf Synthesegas im Vergleich zum heterotrophen Wachstum auf Fruktose

Da am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der TU München nicht die Möglichkeiten gegeben waren, aufgrund des hohen Gehalts an toxischem CO sicher mit Synthesegas zu arbeiten, wurde *C. ljungdahlii* an der Universität Ulm auf diesem Substrat kultiviert, die Zellen geerntet und anschließend auf Trockeneis an den Lehrstuhl für Mikrobiologie an der TU München versandt. Dies wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Lehrstuhl von Prof. Peter Dürre von Michael Köpke durchgeführt.

Es wurden Zellen der exponentiellen ( $OD_{600} = 0,3$ ) geerntet. Von diesen Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit RNA isoliert und damit Transkriptionsanalysen durchgeführt. Zur Isolation von RNA wurde *C. ljungdahlii* auf Synthesegas in 200 mL Medium in 1000 mL-Kulturflaschen kultiviert und die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Auf Fruktose gewachsene Zellen wurden ebenfalls in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer  $OD_{600}$  von ca. 0,3 – 0,5 geerntet. Es wurde jeweils PETC-Medium zur Kultivierung verwendet.

#### **Wachstum von *C. ljungdahlii* auf Synthesegas – Ergebnisse aus der Dissertation von Michael Köpke**

Im Rahmen der Dissertation von Michael Köpke wurden das Wachstum und die Produktbildung im Wachstumsverlauf gemessen. Dabei wurde gezeigt, dass *C. ljungdahlii* bei Wachstum in 200 mL PETC-Medium in einer 1000 mL- Kulturflaschen auf Synthesegas ca. 30 mM Acetat und 15 mM Ethanol bildet (Abb. 17). Die Wachstumsrate  $\mu$  beträgt unter diesen Bedingungen  $0,09 \text{ h}^{-1}$  mit einer Verdopplungszeit  $t_D$  von 8h bei exponentiellen Wachstum (Köpke, 2009b).

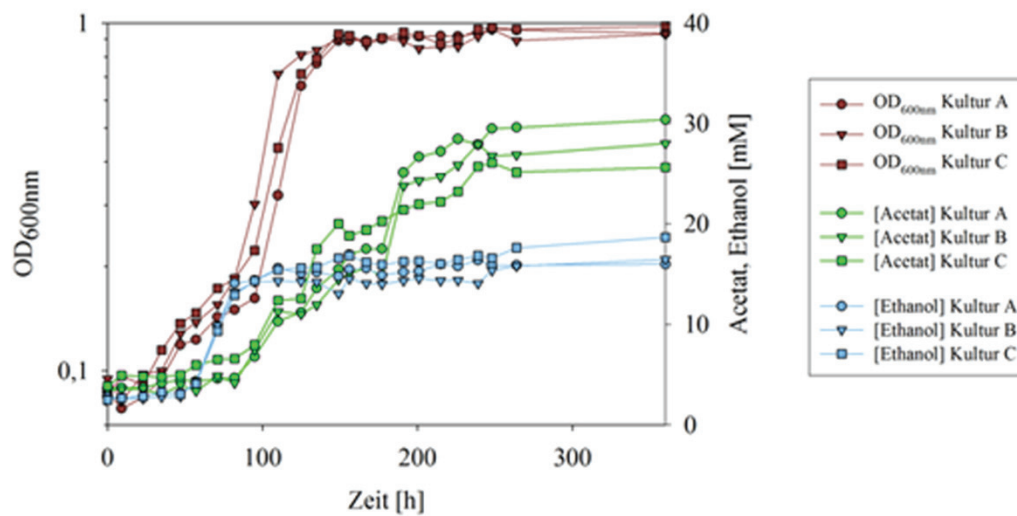


Abb. 17: Wachstum von *C. ljungdahliae* mit Synthesegas (Köpke, 2009b)

### Expressionsdaten für die Gene des autotrophen Stoffwechsels

Zunächst wurde das Augenmerk der Transkriptionsanalyse auf Gene gelegt, die eine Rolle im autotrophen Stoffwechsel spielen. Sowohl bei Wachstum auf Synthesegas als auch bei heterotrophen Wachstum auf Fruktose ist der Wood-Ljungdahl-Weg involviert. Beim Abbau von Fruktose über die Glykolyse entstehen je Molekül Fruktose zwei Moleküle Acetat und zwei Moleküle CO<sub>2</sub>, die wiederum durch den Wood-Ljungdahl-Weg in ein Molekül Acetat umgesetzt werden können. Daher wird dieser autotrophe Stoffwechselweg auch bei heterotrophen Wachstum genutzt.

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse sind in Abb. 18, eine Übersicht der beteiligten Gene mit Expressionsratios ist in Tab. 16 dargestellt.

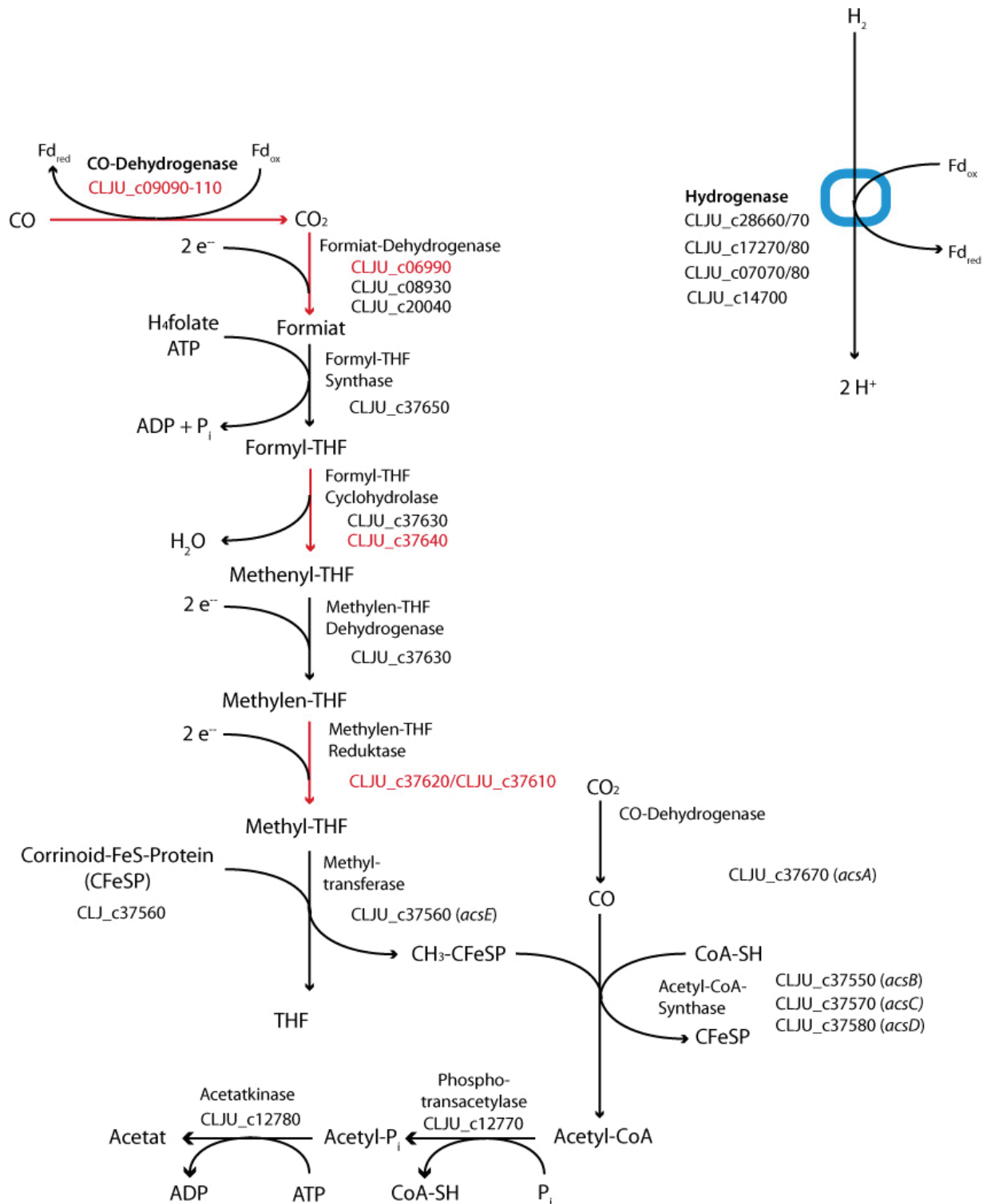


Abb. 18: Schematische Darstellung des Wood-Ljungdahl-Wegs und der Hydrogenasen. Angegeben sind die an den Reaktionen beteiligten Gene. Grüne Pfeile und Gennummern würden eine erhöhte Genexpression bei Verwertung von Synthesegas darstellen, rote Pfeile eine entsprechen einer höheren Genexpression bei Wachstum mit Fruktose. Die Funktionen der Gene und ihre Expressionsverhältnisse sind in Tab. 16 angegeben.

## Ergebnisse

Tab. 16: **Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs und der Hydrogenasen bei Wachstum auf Synthesegas im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Synthesegas dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Gene für Formiat-Dehydrogenasen</b>			
	CLJU_c06990	Formiatdehydrogenase (Selenoprotein)	-1,5
	CLJU_c08930	Formiatdehydrogenase	n.b.
<i>fdhA</i>	CLJU_c20040	Formiatdehydrogenase (Selenoprotein)	0,7
<b>Cluster mit Genen des Wood-Ljungdahl-Wegs</b>			
	CLJU_c37530	Protein mit einer Ferredoxin-Domäne	-1,8
<i>gcvH2</i>	CLJU_c37540	Glycine cleavage System H Protein	-1,5
<i>acsB</i>	CLJU_c37550	CODH/ACS $\beta$ - Untereinheit	-0,9
<i>acsE</i>	CLJU_c37560	CODH/ACS Methyltransferase	-0,9
<i>acsC</i>	CLJU_c37570	CODH/ACS $\gamma$ - Untereinheit	-0,4
<i>acsD</i>	CLJU_c37580	CODH/ACS $\delta$ - Untereinheit	-0,3
<i>cooC1</i>	CLJU_c37590	Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH	-1,4
<i>acoL</i>	CLJU_c37600	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase	-0,4
<i>metF</i>	CLJU_c37610	Methylen-THF Reduktase	-1,2
	CLJU_c37620	Mögliche kl. Untereinheit der Methylen-THF Reduktase, Zinkfinger-Bindemotiv	-1,0
<i>fold</i>	CLJU_c37630	Methylen-THF Dehydrogenase/Methenyl-THF Cyclohydrolase	-0,8
<i>ftcd</i>	CLJU_c37640	Formyl-THF Cyclohydrolase	-1,0
<i>fhs</i>	CLJU_c37650	Formiat-THF Ligase	0,2
<i>cooC2</i>	CLJU_c37660	Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH	-1,6
<i>acsA</i>	CLJU_c37670	CODH/ACS $\alpha$ -Untereinheit	-0,3
<i>pta</i>	CLJU_c12770	Phosphotransacetylase	0,3
<i>ack</i>	CLJU_c12780	Acetatkinase	0,7
<b>anaerobe CO-Dehydrogenase: Untereinheiten</b>			
	CLJU_c09090	FAD/NAD-abhängige Oxidoreduktase-Untereinheit	-2,2
	CLJU_c09100	Elektrontransfer-Untereinheit	-1,8
	CLJU_c09110	katalytische Untereinheit	-1,4
<b>Hydrogenasen</b>			
	CLJU_c07070	Fe-Fe-Hydrogenase 2	-0,3
<i>hycB</i>	CLJU_c07080	Fe-S-cluster-haltige Hydrogenase Komponent 2	-0,1
	CLJU_c14700	Fe-haltige Hydrogenase	n.b.
	CLJU_c17270	Elektrontransport Protein	0,2
	CLJU_c17280	Fe-Fe-Hydrogenase 2	0,7
<i>hyaB</i>	CLJU_c28660	Ni-Fe-Hydrogenase 1, große Untereinheit	n.b.
<i>hyaA</i>	CLJU_c28670	Ni-Fe-Hydrogenase 1, kleine Untereinheit	n.b.



Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse für die Gene, die hauptsächlich für das autotrophe Wachstum verantwortlich sind, sind in Abb. 18 und Tab. 16 dargestellt. CO<sub>2</sub> wird von der Formiat-Dehydrogenase zu einer Formyl-Gruppe reduziert, die an den Cofaktor THF gebunden ist. Von den drei im Genom kodierten Formiat-Dehydrogenasen ist eine davon (CLJU\_c06990) bei Wachstum auf Fruktose hochreguliert.

Neben der Formiat-Dehydrogenase konnte für die einige Gene des Wood-Ljungdahl-Weges eine Änderung der Expressionsverhältnisse beobachtet werden. In dem Cluster mit den Genen des Wood-Ljungdahl-Wegs (CLJU\_c37530 – CLJU\_c37670) ist die Genexpression bei Wachstum auf Fruktose bei CLJU\_c37530, dem Protein H der Glycin-Dehydrogenase (CLJU\_c37540), den beiden Kopien von *cooC* (CLJU\_c37950 und CLJU\_c37660), den beiden Untereinheiten der Methylen-THF-Reduktase und der Formyl-THF-Cyclohydrolase erhöht. Die letzten beiden Schritte der Acetat-Synthese von Acetyl-CoA werden von der Phosphotransacetylase (CLJU\_c12770) und der Acetat-Kinase (CLJU\_c12780) katalysiert. Beide Gene zeigen keine Regulation der Genexpression.

Weitere Gene, die eine Bedeutung in autotrophen Stoffwechselwegen haben sind Hydrogenasen, die H<sub>2</sub> in 2 H<sup>+</sup> spalten. Hier konnte keine Änderung der Expression festgestellt werden. Außerdem ist im Genom eine weitere anaerobe CO-Dehydrogenase mit drei Untereinheiten kodiert (CLJU\_c09090-110). Diese Gene zeigen auch eine erhöhte Expression bei Wachstum auf Fruktose.

### **Expressionsdaten der Gene zur Bildung von Ethanol**

Es wurde gezeigt, dass *C. ljungdahlii* bei Wachstum auf Synthesegas neben Acetat auch eine größere Menge Ethanol produziert (Verhältnis Acetat/Ethanol 2:1). Im Gegensatz dazu produziert der Organismus bei Wachstum auf Fruktose nur sehr geringe Mengen Ethanol. Hier liegt das Verhältnis von Acetat:Ethanol mit 21:1 sehr stark auf Seite des Acetats. Um Ethanol zu produzieren, wird Acetat zuerst zu Acetaldehyd und anschließend zu Ethanol umgewandelt. Im Genom von *C. ljungdahlii* kann man mehrere Gene identifizieren, die diese beiden Reaktionen katalysieren können. Für die Reaktion von Acetat zu Acetaldehyd konnten im Genom drei Gene identifiziert werden. Von den identifizierten Acetaldehyd-Dehydrogenasen, Aldehyd-Oxidoreduktasen und Aldehyde:Ferredoxin-Oxidoreduktasen waren die beiden Aldehyde:Ferredoxin-Oxidoreduktasen (CLJU\_c20110 und CLJU\_c21210) und eine der beiden putativen Aldehyd-Oxidoreduktasen (CLJU\_c24130)

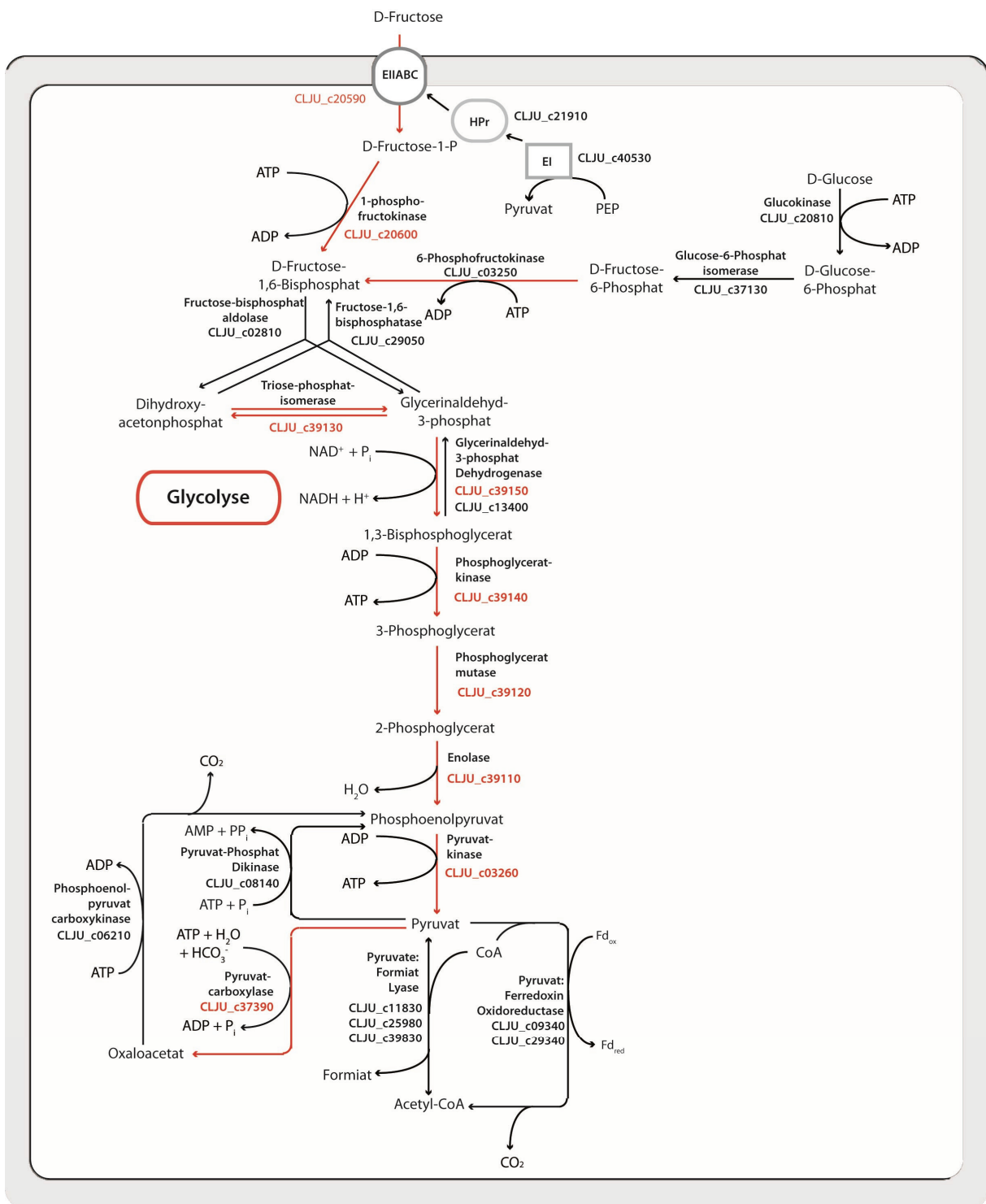
bei Wachstum auf Synthesegas hochreguliert, wie aus Tab. 17 zu entnehmen ist. Die zweite Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol wird von Alkohol-Dehydrogenasen katalysiert. Von den gefundenen möglichen Alkohol-Dehydrogenasen konnte eine Zink-haltige Alkohol-Dehydrogenase (CLJU\_c24860) identifiziert werden, die bei Wachstum auf Synthesegas bei allen Experimenten hochreguliert war. Ebenso konnten zwei weitere Alkohol-Dehydrogenasen (CLJU\_c23220; CLJU\_c24880) identifiziert werden, die nur in einem Teil der Experimente eine erhöhte Genexpression bei Wachstum auf Synthesegas zeigten.

**Tab. 17: ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der regulierten Gene zur Bildung von Ethanol bei Wachstum auf Synthesegas im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Synthesegas dar. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Aldehyd-Oxidoreduktasen</b>			
CLJU_c20110		Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase	7,5
CLJU_c20120		Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase	6,5
CLJU_c24130		W-haltige Aldehyd-Oxidoreduktase	4,8
<b>Alkohol-Dehydrogenase</b>			
CLJU_c24860		Zink-haltige Alkohol-Dehydrogenase	3,3

### Expressionsdaten der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und des Pyruvatmetabolismus

Da bei Wachstum auf Synthesegas – im Gegensatz zu Wachstum auf Fruktose – keine Zucker abgebaut werden, ist die Expression der Gene des PTS-Systems zur Aufnahme in die Zelle und der Glykolyse bei Wachstum auf Fruktose erhöht. Die einzige Ausnahme bildet die Fruktose-Bisphosphat-Aldolase (CLJU\_c02810), bei der keine Regulation zu beobachten ist. Pyruvat kann von *C. ljungdahlii* über verschiedene Enzyme abgebaut werden, wobei nur die Pyruvat-Carboxylase (CLJU\_c37390) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (CLJU\_c06210) unter Fruktose-Bedingungen eine erhöhte Genexpression zeigen. Mit Ausnahme der Pyruvat-Phosphat-Dikinase (CLJU\_c08140) und einer der beiden Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktasen (CLJU\_c09340), bei denen man keine Expressionsänderung feststellen kann, sind bei den anderen Genen die Signale der Spots so schwach, dass man daraus keine Rückschlüsse auf die Regulation ziehen kann.



**Abb. 19: Schematische Darstellung der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und Pyruvat-Metabolismus;** Angegeben sind die an den Reaktionen beteiligten Gene. Grüne Pfeile und Nummern würden eine erhöhte Genexpression bei Verwertung von Synthesegas darstellen, rote Pfeile entsprechen einer höheren Genexpression bei Wachstum mit Fruktose. Die Funktionen der Gene und ihre Expressionsverhältnisse sind in Tab. 18 angegeben.

## Ergebnisse

**Tab. 18: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der beteiligten Gene der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und des Pyruvatmetabolismus bei Wachstum auf Synthesegas im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Synthesegas dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Gene der Glykolyse</b>			
CLJU_c03250	<i>pfk</i>	6-Phosphofruktokinase	-2,6
CLJU_c03260	<i>pyk</i>	Pyruvat-Kinase	-2,9
CLJU_c39110	<i>eno</i>	Enolase	-3,0
CLJU_c39120	<i>pgm</i>	2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase	-3,5
CLJU_c39130	<i>tim</i>	Triosephosphat-Isomerase	-2,7
CLJU_c39140	<i>pgk</i>	Phosphoglycerat-Kinase	-2,6
CLJU_c39150	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	-2,7
CLJU_c39160		möglicher Transkriptionsregulator	-3,4
CLJU_c02810	<i>fba</i>	Fruktose-Bisphosphat-Aldolase	0,6
CLJU_c13400	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	-1,4
<b>Pyruvat-Metabolismus</b>			
CLJU_c37390	<i>pyc</i>	Pyruvat-Carboxylase	-1,2
CLJU_c06210	<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxy-Kinase	-1,2
CLJU_c09340	<i>pfor</i>	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	-0,4
CLJU_c29340	<i>pfor</i>	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	n.b.
CLJU_c08140	<i>ppdK</i>	Pyruvat-Phosphat-Dikinase	0,2
CLJU_c38600	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvat-Synthase	n.b.
CLJU_c11830	<i>pfl1</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	n.b.
CLJU_c25980	<i>pfl2</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	n.b.
CLJU_c39830	<i>pfl3</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	n.b.
<b>PTS-System</b>			
CLJU_c40530		Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase	-0,9
CLJU_c21910	<i>HPr</i>	predicted HPr Kinase/Phosphorylase	-0,6
CLJU_c20590		Fruktose-spezifisches PTS system, IIABC Komponente	-4,3
CLJU_c20600	<i>fruB</i>	1-Phosphofruktokinase	-4,0
CLJU_c20610		Transkriptionsregulator, DeoR Familie	-5,2

## Expressionsdaten der Gene für Gluconatverwertung

Bei Wachstum auf Synthesegas sind verschiedene Gene hochreguliert, die in Verbindung mit dem Abbau von Gluconat stehen. Dazu zählen eine Gluconokinase (CLJU\_c11610), einen Gluconat/H<sup>+</sup>-Symporter (CLJU\_c11600) und eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (CLJU\_c11590). Diese Gene katalysieren den Transport von Gluconat in die Zelle und die Umsetzung in D-Ribulose-5-Phosphat, das wiederum in den Pentose-Phosphat-Weg eingeschleust werden kann.

Obwohl diese Gene unter autotrophen Bedingungen eine erhöhte Expression haben, haben diese Gene keinen direkten Zusammenhang mit dem autotrophen Stoffwechsel. Die Genorganisation ist in Abb. 20 und die Annotation und das Expressionsverhältnis der Gene sind in Tab. 19 dargestellt.



**Abb. 20: Schematische Anordnung der Gencluster zur Gluconatverwertung und der angrenzenden Gene im Genom von *C. ljungdahlii*.** Mögliche Funktion der Gene und Expressionsverhältnisse sind in Tab. 19 aufgelistet.

**Tab. 19: Expressionsverhältnisse des Genclusters mit Genen der Gluconatverwertung bei Wachstum auf Synthesegas im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Synthesegas dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Verwertung von Gluconat</b>		
CLJU_c11560	Zink-haltige Alkohol-Dehydrogenase	0,9
CLJU_c11570	Xylulosekinase	1,7
CLJU_c11580	D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	1,9
CLJU_c11590	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	1,8
CLJU_c11600	Gluconat/H <sup>+</sup> -Symporter	3,5
CLJU_c11610	Gluconokinase	2,8
CLJU_c11620	mögliche D-isomer-spezifische 2-Hydroxysäure-Dehydrogenase	2,5
CLJU_c11630	2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase	2,5

### **Rnf-Komplex und Thioredoxinreduktase**

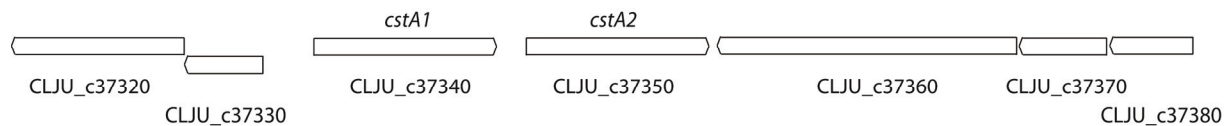
Unter heterotrophen Wachstumsbedingungen mit Fruktose kann *C. ljungdahlii* Energie mittels Substratkettenphosphorylierung während der Glykolyse gewinnen. Jedoch besteht diese Möglichkeit bei autotrophen Wachstum auf Synthesegas nicht. Hier wird CO über den Wood-Ljungdahl-Weg umgewandelt in Acetat. Hierbei ist der Netto-Umsatz von ATP gleich Null. Bei der Suche nach weiteren Enzymkomplexen, die der Energiegewinnung dienen können, konnte im Genom ein Cluster von Genen identifiziert werden, die große Ähnlichkeit haben zu einer NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Rnf-Komplex). Neuere Forschungen haben gezeigt, dass dieser membranständige Enzymkomplex an der Etablierung eines Protonengradienten beteiligt ist, durch den die  $F_1F_0$ -ATPase angetrieben wird. Bei den hier verwendeten Versuchsbedingungen konnte kein Unterschied in der Genexpression der Gene des Rnf-Komplexes festgestellt werden.

Das Thioredoxin-System ist in allen drei Bereichen des Lebens – Eukaryoten, Archaeen und Prokaryoten – vertreten. Es besteht aus Thioredoxin, einer Thioredoxin-Reduktase und NADPH. Als Dithiol-Disulfid-Oxidoreduktasen katalysieren Thioredoxine die Reduktion von Disulfiden in verschiedenen Enzymen. Die reversiblen Dithiol-Disulfid Reaktionen werden in Reaktionsmechanismen von Enzymen wie der Ribonucleotid-Reduktase verwendet und sind geeignet, die Funktionalität von Proteinen anhand des Redox-Zustands ihrer SH-Gruppen zu kontrollieren. Das oxidierte Thioredoxin wird durch eine NADPH-abhängige, FAD-haltige Thioredoxin-Reduktase regeneriert. Die Disulfid-Reduktase Aktivität des Thioredoxin hängt u. a. von der Verfügbarkeit von NADPH und der Aktivität der Thioredoxin-Reduktase ab (Arnér & Holmgren, 2000). Im Genom von *C. ljungdahlii* konnten drei Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Gene identifiziert werden, von denen jedoch zwei mit Betain-Reduktasen assoziiert sind und auch keine signifikanten Signale der Spots erkennen lassen. Das dritte ORF-Paar (CLJU\_c40490/500) zeigte mit Werten von -1,6 bei der Thioredoxin-Reduktase (CLJU\_c40490) bzw. -2,0 bei Thioredoxin (CLJU\_c40500) eine verringerte Genexpression bei Wachstum auf Synthesegas.

### **Weitere Gene mit erhöhter Genexpression bei Wachstum auf Synthesegas**

Ein weiteres Gen, das eine auffällige Regulation bei Wachstum auf Synthesegas zeigte, ist das *cstA* (CLJU\_c37340), ein *carbon starvation protein*, das bei autotrophen Wachstumsbedingungen mit einem Wert von 4,9 eine verstärkte Expression aufweist. In

*E. coli* wird vermutet, dass das Membranprotein CstA eine Rolle im Peptidkatabolismus spielt (Schultz & Matin, 1991). Direkt *downstream* des Gens findet man ein zweites *cstA* (CLJU\_c37350), das eine Ähnlichkeit von 94% auf Proteinebene hat. Bei diesem Gen konnten keine signifikanten Fluoreszenzsignale beobachtet werden.

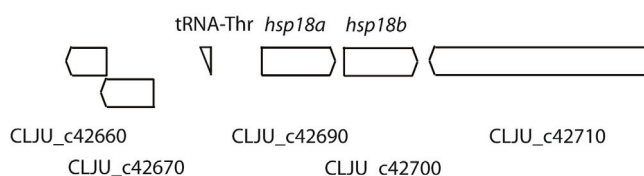


**Abb. 21: Schematische Anordnung der ORFs der zwei Kopien von *cstA* und der angrenzenden Gene im Genom von *C. ljungdahlii*.** Mögliche Funktionen und Expressionsverhältnisse der Gene in Tab. 20 aufgelistet.

**Tab. 20: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der in Abb. 21 gezeigten Gene bei Wachstum auf Synthesegas im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Synthesegas dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n.b.: nicht bestimmt

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
CLJU_c37320		putativer Regulator, LytR/AlgR Familie	-0,4
CLJU_c37330		putativer 2-Komponenten Sensor Histidin Kinase	-0,6
CLJU_c37340	<i>cstA1</i>	<i>Carbon Starvation Protein A</i>	4,9
CLJU_c37350	<i>cstA2</i>	<i>Carbon Starvation Protein A</i>	n.b.
CLJU_c37360		putative Peptidase	-0,4
CLJU_c37370		putative Esterase	-0,4
CLJU_c37380		Pyrroline-5-carboxylat-Reduktase	-0,4

Außerdem konnte eine erhöhte Genexpression während des Wachstums auf Synthesegas bei einem Gen (CLJU\_c42690) für ein Hitzeschockprotein (*hsp18a*) festgestellt werden. Auch bei diesem Gen liegt *downstream* ein weiteres Gen für Hsp18 (CLJU\_c42700; *hsp18b*), das eine 93%ige Ähnlichkeit aufweist. Auch diese zweite Genkopie des kleinen Hitzeschockproteins ist mit einem Wert von 4,2 stärker als bei Wachstum auf Fruktose exprimiert, wenn auch nicht so stark, wie *hsp18a*. Diese kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) sind molekulare Chaperone, die die Aggregation von Proteinen verhindern und vor Zellstress schützen (Feder & Hofmann, 1999; Jobin *et al.*, 1997).



**Abb. 22: Schematische Anordnung des ORFs der zwei Kopien von *hsp18* und der angrenzenden Gene im Genom von *C. ljungdahlii*.** Mögliche Funktion und Expressionsverhältnisse der Gene sind in Tab. 21 aufgelistet

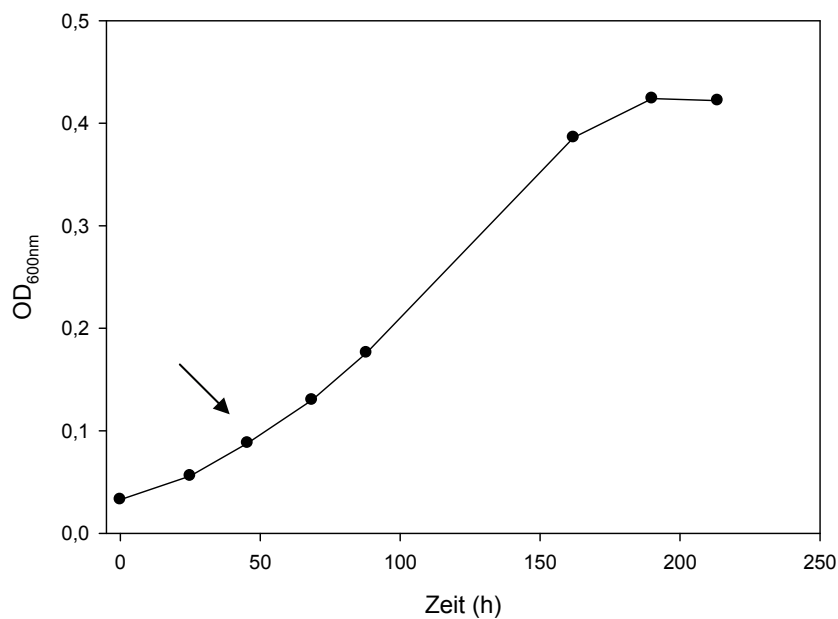
**Tab. 21: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der in Abb. 22 gezeigten Gene in der Umgebung von *hsp18* bei Wachstum auf Synthesegas im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Synthesegas dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n.b.: nicht bestimmt

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
CLJU_c42660		hypothetisches Protein	n.b.
CLJU_c42670		hypothetisches Protein	n.b.
CLJU_c42690	<i>hsp18a</i>	18kDa <i>heat shock protein</i>	5,0
CLJU_c42700	<i>hsp18b</i>	18kDa <i>heat shock protein</i>	4,2
CLJU_c42710		putative DNA Helicase	-0,6

### 3.2.4.2. Transkriptionsanalysen des autotrophen Wachstums auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> im Vergleich zum heterotrophen Wachstum auf Fruktose

*C. ljungdahlii* kann zusätzlich zum Wachstum auf Synthesegas auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) wachsen. Dabei wird jedoch im Gegensatz zum Wachstum auf Synthesegas kein Ethanol gebildet (Köpke, 2009b). Auch hier wurden Wachstumsversuche durchgeführt und der Organismus in 120mL Medium in 1000 mL-Kulturflaschen mit dem Substrat H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) bei 37°C kultiviert. Die maximal erreichte OD<sub>600</sub> betrug ca. 0,4. Um die Gas-/Flüssigkeitsoberfläche zu vergrößern, wurden Versuche durchgeführt, den Organismus in liegenden Kulturflaschen oder unter leichtem Schütteln zu kultivieren. Hierbei zeigte sich keine Verbesserung des Wachstums bei liegenden Flaschen und sogar eine Verminderung des Wachstums beim Schütteln der Kulturen (Ergebnisse nicht gezeigt).



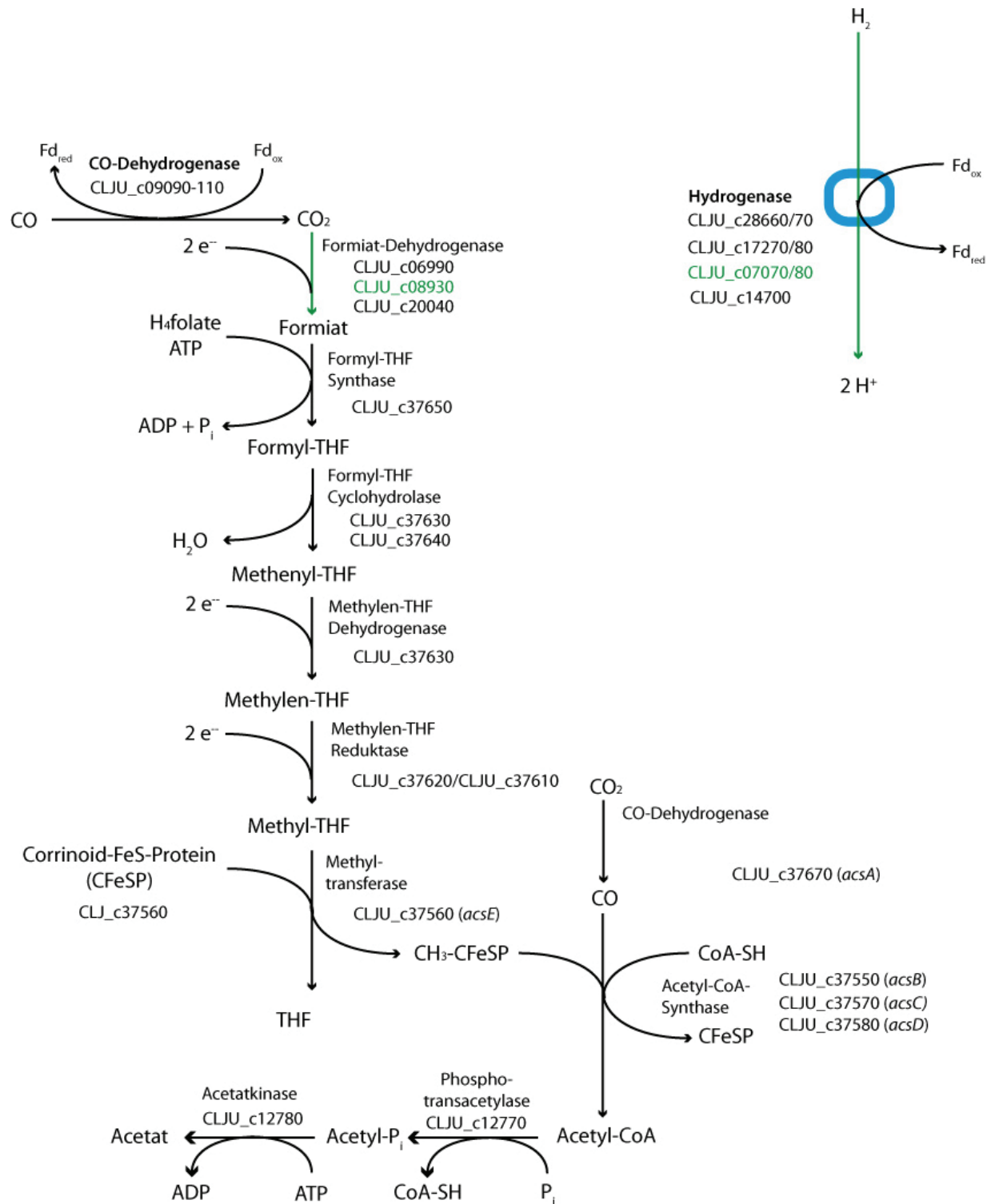


**Abb. 23:** Wachstumskurve von *C. ljungdahlii* mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)); Der Pfeil zeigt exemplarisch den Zeitpunkt, an dem Zellen für die Transkriptionsanalyse geerntet wurden. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Abbildung zeigt eine repräsentative Einzelmessung.

Zur Durchführung von Transkriptionsanalysen wurden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und gegen die Genexpression von auf Fruktose gewachsenen Zellen der logarithmischen Wachstumsphase verglichen.

### Expressionsdaten der Gene des autotrophen Stoffwechsels

Auch hier wurde wieder das Hauptaugenmerk der Transkriptionsanalysen auf Gene gelegt, die eine Rolle im autotrophen Stoffwechsel spielen (Stoffwechselschema siehe Abb. 24 und Tab. 22).



**Abb. 24: Schematische Darstellung des Wood-Ljungdahl-Wegs und der Hydrogenasen.** Angegeben sind die an den Reaktionen beteiligten Gene. Grüne Pfeile und Gennummern stellen eine erhöhte Genexpression bei Verwertung von H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> dar, rote Pfeile würden einer höheren Genexpression bei Wachstum mit Fruktose entsprechen. Die Funktionen der Gene und ihre Expressionsverhältnisse sind in Tab. 22 angegeben.

**Tab. 22: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs und der Hydrogenasen bei Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n.b.: nicht bestimmt

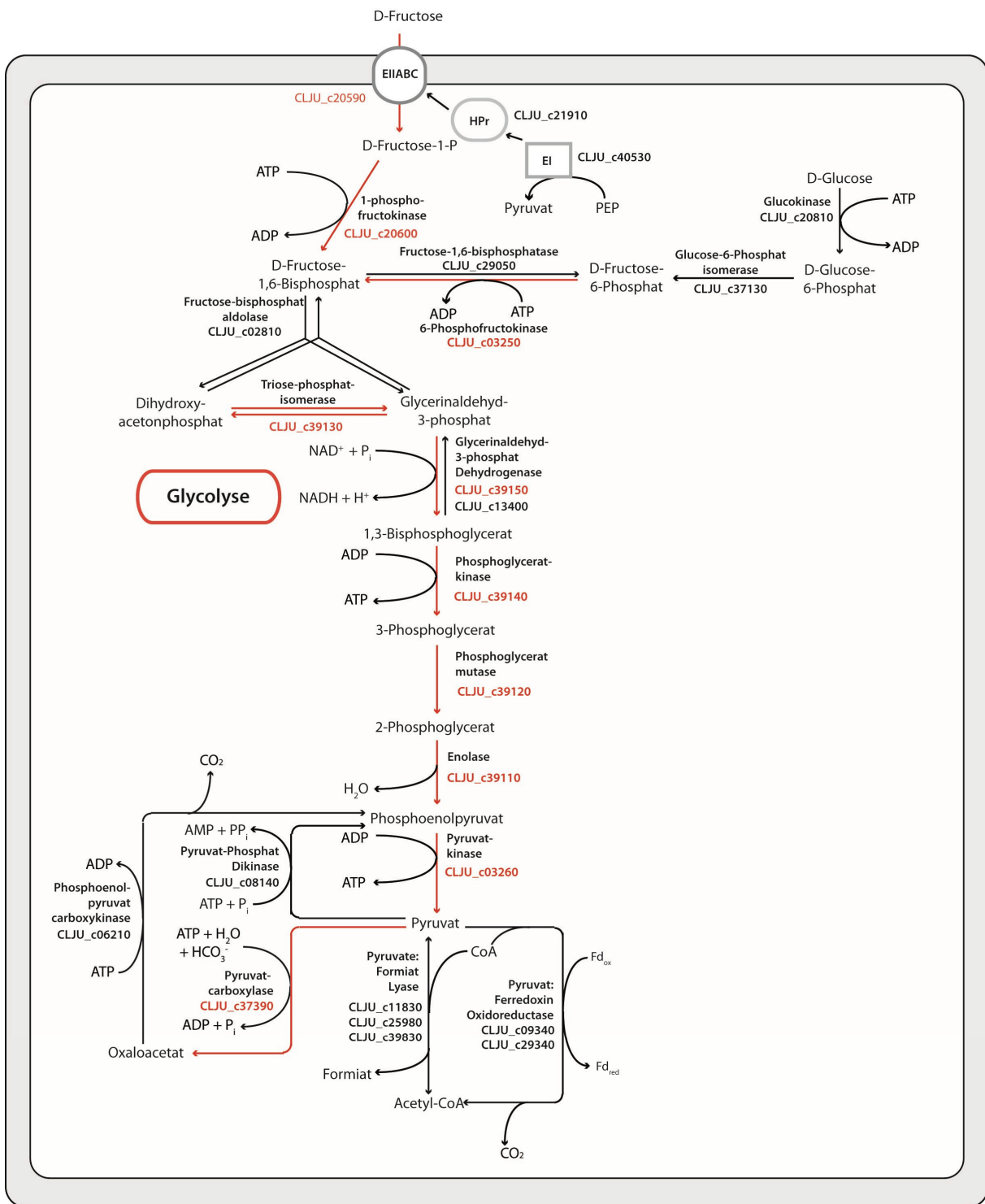
ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Gene für Formiat-Dehydrogenasen</b>			
	CLJU_c06990	Formiat-Dehydrogenase (Selenoprotein)	-0,2
	CLJU_c08930	Formiat-Dehydrogenase	1,7
<i>fdhA</i>	CLJU_c20040	Formiat-Dehydrogenase (Selenoprotein)	0,97
<b>Cluster mit Genen des Wood-Ljungdahl-Wegs</b>			
	CLJU_c37530	Protein mit einer Ferredoxin-Domäne	-0,3
<i>gcvH2</i>	CLJU_c37540	Glycine cleavage System H Protein	-0,2
<i>acsB</i>	CLJU_c37550	CODH/ACS β- Untereinheit	0,2
<i>acsE</i>	CLJU_c37560	CODH/ACS Methyltransferase	0,4
<i>acsC</i>	CLJU_c37570	CODH/ACS γ- Untereinheit	0,08
<i>acsD</i>	CLJU_c37580	CODH/ACS δ- Untereinheit	0,07
<i>cooC1</i>	CLJU_c37590	Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH	0,3
<i>acoL</i>	CLJU_c37600	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase	0,5
<i>metF</i>	CLJU_c37610	Methylen-THF-Reduktase	0,4
	CLJU_c37620	Mögliche kl. Untereinheit der Methylen-THF-Reduktase, Zinkfinger-Bindemotiv	0,5
<i>fold</i>	CLJU_c37630	Methylen-THF-Dehydrogenase/Methenyl-THF-Cyclohydrolase	0,4
<i>ftcd</i>	CLJU_c37640	Formyl-THF-Cyclohydrolase	0,5
<i>fhs</i>	CLJU_c37650	Formiat-THF-Ligase	0,9
<i>cooC2</i>	CLJU_c37660	Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH	0,9
<i>acsA</i>	CLJU_c37670	CODH/ACS α -Untereinheit	0,9
<i>pta</i>	CLJU_c12770	Phosphotransacetylase	-0,2
<i>ack</i>	CLJU_c12780	Acetat-Kinase	0,0
<b>anaerobe CO-Dehydrogenase: Untereinheiten</b>			
	CLJU_c09090	FAD/NAD-abhängige Oxidoreduktase-Untereinheit	-*
	CLJU_c09100	Elektrontransfer-Untereinheit	-*
	CLJU_c09110	katalytische Untereinheit	-*
<b>Hydrogenasen</b>			
	CLJU_c07070	Fe-Fe-Hydrogenase 2	1,1
<i>hycB</i>	CLJU_c07080	Fe-S-cluster-haltige Hydrogenase Komponente 2	1,3
	CLJU_c14700	Fe-haltige Hydrogenase	n.b.
	CLJU_c17270	Elektronentransportprotein	0,6
	CLJU_c17280	Fe-Fe-Hydrogenase 2	0,01
<i>hyaB</i>	CLJU_c28660	Ni-Fe-Hydrogenase 1, große Untereinheit	n.b.
<i>hyaA</i>	CLJU_c28670	Ni-Fe-Hydrogenase 1, kleine Untereinheit	n.b.

\*die anaerobe CO Dehydrogenase wird in den verschiedenen Experimenten unterschiedlich reguliert, so dass kein Mittelwert gebildet wurde

CO<sub>2</sub> wird von der Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert und dieses an den Co-Faktor THF gebunden. Von den drei vorhandenen Formiat-Dehydrogenasen ist bei CLJU\_c08930 die Expression erhöht. Diese Formiat-Dehydrogenase ist als einzige von den im Genom identifizierten Genen kein Selenoprotein. Für die Gene des Wood-Ljungdahl-Weges, die im großen Cluster organisiert sind, konnte keine Änderung der Expression beobachtet werden. Ebenso zeigen die Phosphoacetylase (CLJU\_c12770) und die Acetat-Kinase (CLJU\_c12780) keine Regulation der Genexpression. Die zusätzliche anaerobe CO-Dehydrogenase (CLJU\_c09090-110) zeigt keine einheitliche Regulation, so dass die Gene z.T. bei autotrophem Wachstum, z.T. bei Wachstum auf Fruktose eine verstärkte Genexpression zeigen. Weitere wichtige Elemente bezüglich des Wachstums auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> sind Hydrogenasen, die H<sub>2</sub> in 2 H<sup>+</sup> spalten. Hier zeigte nur eine Fe-Fe-Hydrogenase (CLJU\_c07070-80) eine 2-2,5fach erhöhte Genexpression bei autotrophen Wachstum; die restlichen Hydrogenasen zeigten keine Regulation oder nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal, so dass die Gene meist durch die angelegten Qualitätsparameter herausgefiltert wurden.

### **Expressionsdaten der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und des Pyruvatmetabolismus**

Auch hier ist die Expression der meisten Gene der Glykolyse und des PTS-Systems bei autotrophem Wachstum schwächer als bei auf Fruktose gewachsenen Zellen, mit Ausnahme der Fruktose-bisphosphat-Aldolase und einer zweiten Kopie der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (CLJU\_c13400), die allein im Genom vorliegt (siehe Tab. 23 und Abb. 25). Ebenso wie bei Wachstum auf Synthesegas ist das Gen für eine Pyruvat-Carboxylase (CLJU\_c37390) bei Fruktose stärker exprimiert, jedoch ist die Expression einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (CLJU\_c06210) bei Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mit einem logarithmischen Wert von 1,0 leicht hochreguliert.



**Abb. 25: Schematische Darstellung der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und Pyruvat-Metabolismus;** Angegeben sind die an den Reaktionen beteiligten Gene. Grüne Pfeile und Nummern würden eine erhöhte Genexpression bei Verwertung von H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> darstellen, rote Pfeile entsprechen einer höheren Genexpression bei Wachstum mit Fruktose. Die Funktionen der Gene und ihre Expressionsverhältnisse sind in Tab. 23 angegeben.

## Ergebnisse

**Tab. 23: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der beteiligten Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und des Pyruvatmetabolismus bei Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Gene der Glykolyse</b>			
CLJU_c03250	<i>pfk</i>	6-Phosphofruktokinase	-2,6
CLJU_c03260	<i>pyk</i>	Pyruvat-Kinase	-3,0
CLJU_c39110	<i>eno</i>	Enolase	-2,7
CLJU_c39120	<i>pgm</i>	2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase	-2,9
CLJU_c39130	<i>tim</i>	Triosephosphat-Isomerase	-2,8
CLJU_c39140	<i>pgk</i>	Phosphoglycerat-Kinase	-2,9
CLJU_c39150	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	-3,5
CLJU_c39160		möglicher Transkriptionsregulator	-3,1
CLJU_c02810	<i>fba</i>	Fruktose-bisphosphat-Aldolase	0,0
CLJU_c13400	<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase	-0,5
<b>Pyruvat-Metabolismus</b>			
CLJU_c37390	<i>pyc</i>	Pyruvat-Carboxylase	-3,0
CLJU_c06210	<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	1,0
CLJU_c09340	<i>pfor</i>	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	-0,1
CLJU_c29340	<i>pfor</i>	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	n.b.
CLJU_c08140	<i>ppdK</i>	Pyruvat-Phosphat-Dikinase	0,7
CLJU_c38600	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvat-Synthase	n.b.
CLJU_c11830	<i>pfl1</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	-0,3
CLJU_c25980	<i>pfl2</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	n.b.
CLJU_c39830	<i>pfl3</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	n.b.
<b>PTS-System</b>			
CLJU_c40530		Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase	-0,2
CLJU_c21910	<i>HPr</i>	predicted HPr Kinase/Phosphorylase	0,5
CLJU_c20590		Fruktose-spezifisches PTS system, IIABC Komponente	-3,9
CLJU_c20600	<i>fruB</i>	1-Phosphofruktokinase	-3,6
CLJU_c20610		Transkriptionsregulator, DeoR Familie	-4,1

## Ethanol-Bildung

Obwohl bei beiden Wachstumsbedingungen kein Ethanol gebildet wird, kann man Unterschiede in der Expression von einigen Alkoholdehydrogenasen beobachten (siehe Tab. 24). Jedoch kann keine Regulation von Genen gefunden werden, die für Aldehyde:Ferredoxin-Oxidoreduktasen, Aldehyd-Oxidoreduktasen oder Acetaldehyd-Dehydrogenasen kodieren.

**Tab. 24: ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der Alkoholdehydrogenasen bzw. Aldehyde Oxidoreduktasen bei Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis
<b>Alkoholdehydrogenasen</b>			
CLJU_c11560		Zink-haltige Alkohol-Dehydrogenase*	1,2
CLJU_c18470		NAD(P)H-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	-2,0
CLJU_c23220		Zink-haltige Alkohol-Dehydrogenase	-0,7
CLJU_c23460		NAD-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	0,1
CLJU_c24880		NAD(P)H-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	-2,2
CLJU_c39950		NAD(P)H-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	0,3
<b>Aldehyde Oxidoreduktasen</b>			
CLJU_c20210		Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase	-0,1
CLJU_c24130		Aldehyd-Oxidoreduktase	0,4

\*Dieses Gen ist in einem Cluster von Genen, die in Zusammenhang mit der Verwertung von Gluconat stehen (siehe Tab. 25)

### Expressionsdaten der Gene für Gluconatverwertung

Wie bei Synthesegas sind Gene hochreguliert, die für die Aufnahme und die Umsetzung von Gluconat zu D-Ribulose-5-Phosphat verantwortlich sind. Hierbei fällt auf, dass man die Gene in zwei Cluster einteilen kann: CLJU\_c11560 – CLJU\_c11590 werden zwar bei Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) mit Werten von 1,2 – 1,9 mäßig hochreguliert, die Gene CLJU\_c11600-CLJU\_c11630 werden mit Werten von 4,1 – 4,3 jedoch ziemlich stark hochreguliert. Die Expressionsverhältnisse der Gene sind in Tab. 25 zusammengefasst.

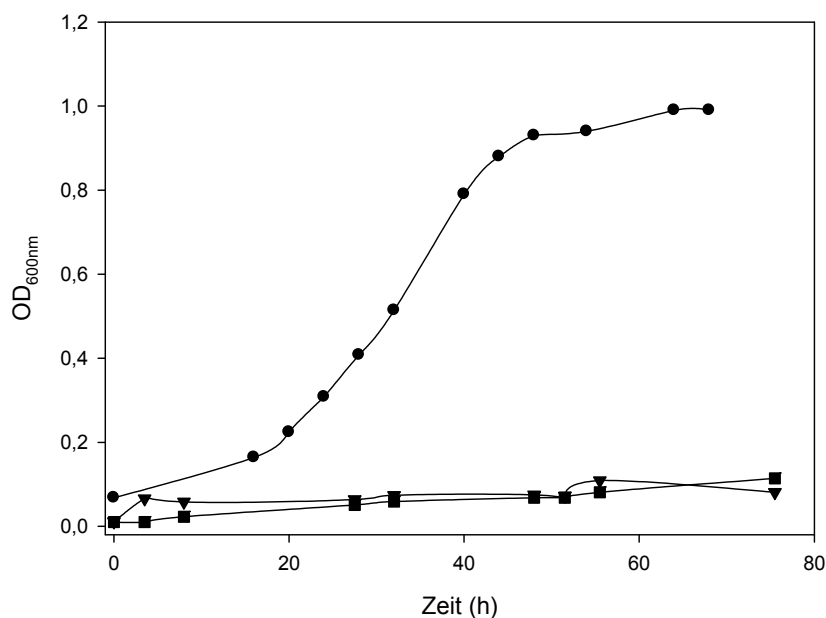
**Tab. 25: Expressionsverhältnisse des Genclusters mit Genen der Gluconatverwertung bei Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis
<b>Verwertung von Gluconat</b>		
CLJU_c11560	Zink-haltige Alkohol-Dehydrogenase	1,2
CLJU_c11570	Xylulosekinase	1,2
CLJU_c11580	D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	1,8
CLJU_c11590	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	1,9
CLJU_c11600	Gluconat/H <sup>+</sup> -Symporter	4,3
CLJU_c11610	Gluconokinase	4,1
CLJU_c11620	mögliche D-isomer-spezifische 2-Hydroxysäure-Dehydrogenase	4,3
CLJU_c11630	2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase	4,2

Ebenso wie bei den Transkriptionsanalysen mit Synthesegas sind die beiden in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** erwähnten Hitzeschockproteine *hsp18a* und *hsp18b* (CLJU\_c42690 bzw. CLJU\_c42700) mit Werten von 4,5 bzw. 4,0 eine erhöhte Genexpression bei Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)).

### 3.2.5. Wachstum auf Betain und Ethanol: eine Stickland-analoge Reaktion

Neben der Fähigkeit, autotroph auf verschiedenen CO- bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasgemische oder heterotroph auf Zuckern zu wachsen, wurde getestet, ob *C. ljungdahlii* auch auf einzelnen Aminosäuren oder einer Kombination von Aminosäuren oder anderen Substanzen zu wachsen. Hierbei konnte nur durch eine der getesteten Kombinationen das Wachstum stimuliert werden. Während auf Betain bzw. Ethanol alleine kein Wachstum zu beobachten war, konnte *C. ljungdahlii* auf einer Kombination der beiden Substanzen bis auf OD<sub>600nm</sub> von ca. 0,9 – 1,2 wachsen (siehe Abb. 26). Dabei reduzierte der Organismus Betain zu Trimethylamin und Acetat und oxidierte Ethanol zu Acetat in einer, den Stickland-Reaktionen ähnlichen Stoffwechsel.

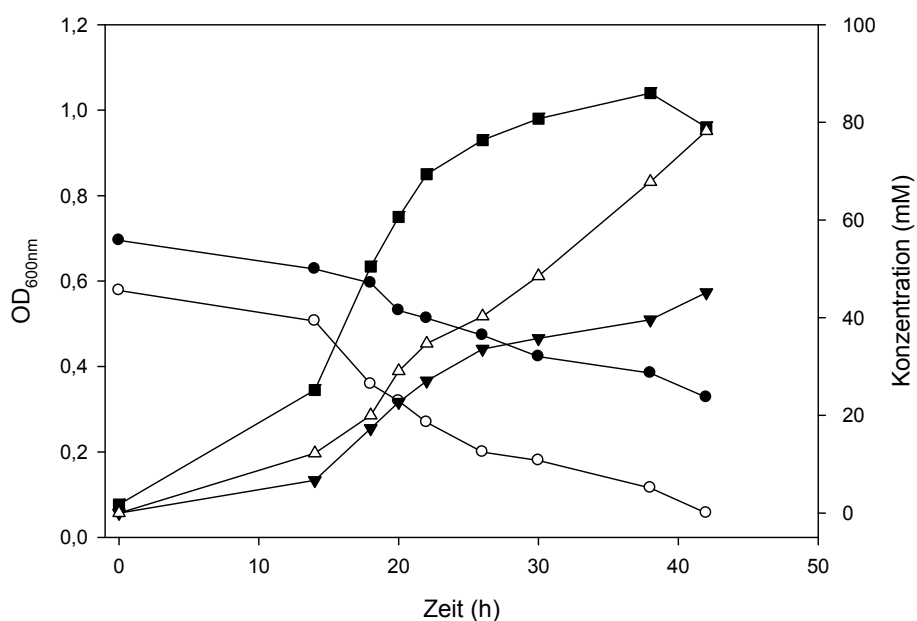


**Abb. 26: Wachstum von *C. ljungdahlii* auf 50mM Ethanol (■), 50mM Betain (▼) und 50mM Betain + 50 mM Ethanol (●). Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.**



### 3.2.5.1. Bestimmung der Fermentationsprodukte der Stickland-ähnlichen Reaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Abbau der Substrate und die Bildung der Fermentationsprodukte analysiert. Die Hauptfermentationsprodukte, die beim Wachstum auf Ethanol und Betain gebildet wurden waren Trimethylamin und Acetat. Dabei wurde Ethanol über Gaschromatographie (2.11.3) bestimmt. Betain, Trimethylamin und Acetat wurden mittels Ionenchromatographie (2.11.1) analysiert. Dafür wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstumsverlaufs Aliquots von je 2 mL der Kultur entnommen, gekühlt abzentrifugiert und der Kulturüberstand bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei Messungen des Verbrauchs von Betain und Ethanol und der Bildung der Fermentationsprodukte Trimethylamin und Acetat über die Zeit, konnte gezeigt werden, dass Betain und Ethanol simultan verbraucht werden (siehe Abb. 27).



**Abb. 27: Wachstum von *C. ljungdahliae* auf Betain und Ethanol.** Hauptfermentationsprodukte sind Acetat und Trimethylamin; OD<sub>600</sub> (■), Betain (○), Ethanol (●), Acetat (△) und Trimethylamin (▼). Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

Dabei wurden 45 mM Betain stöchiometrisch von einer Betainreduktase in Trimethylamin und Acetat umgesetzt, während gleichzeitig 32 mM Ethanol zu Acetat oxidiert werden. Die

Gesamtmenge an Acetat betrug 76 mM. Die Abnahme in der Betainkonzentration entspricht der Zunahme der Menge an Trimethylamin während die produzierte Menge an Acetat gleich der Summe der beiden verbrauchten Substrate ist.

### 3.2.5.2. Transkriptionsanalysen des Wachstums auf Betain und Ethanol im Vergleich zum Wachstum auf Fruktose bzw. autotrophen Wachstums mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>

Auch hier wurde die Genexpression während des Wachstums auf Betain und Ethanol gegen Referenzbedingungen untersucht. Zusätzlich zu den Standardreferenzbedingungen – auf Fruktose gewachsenen Zellen – wurde mit der Genexpression von autotroph auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) gewachsenen Zellen verglichen. Alle Kulturen wurden jeweils in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet.

#### Gekoppelte Ethanol-Oxidation und Betain-Reduktion

Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf Gene gelegt, die an der Umsetzung von Betain und Ethanol zu Trimethylamin und Acetat beteiligt sein könnten. In Abb. 28 sind die Reaktionen der Stickland-ähnlichen Reaktion und die beteiligten Gene eingezeichnet.

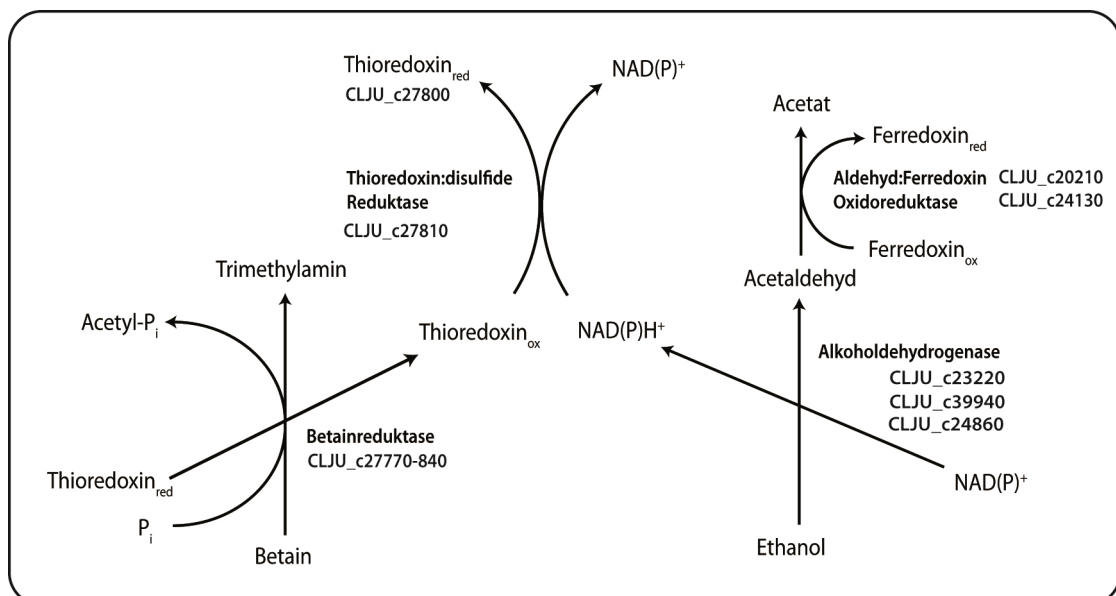


Abb. 28: Schematische Darstellung der beteiligten Gene an der Reduktion von Betain und der gleichzeitigen Oxidation von Ethanol

## Genexpression der Betain-Reduktasen

Im Genom konnten zwei sehr ähnliche Gencluster (CLJU\_c27290 – 360; CLJU\_c27770 - 840) identifiziert werden, die für Betain-Reduktasen kodieren (3.1.8). Die Ähnlichkeit der korrespondierenden Gene der zwei Cluster liegt auf DNA-Ebene jeweils zwischen 81 – 96%. Davon ist jedoch nur ein Cluster (CLJU\_c27770 – 840) hochreguliert. In diesen Clustern sind neben der Untereinheiten der Betain-Reduktase auch jeweils auch ein Gen für einen Betain-Transporter (CLJU\_c27340; CLJU\_c27820), ein Thioredoxin (CLJU\_c27320; CLJU\_c27800) und eine zugehörige Thioredoxin:Disulfid-Reduktase (CLJU\_c27330; CLJU\_c27810). In Tab. 26 sind die Expressionsverhältnisse der beiden Betain-Reduktase-Cluster jeweils im Vergleich zu Fruktose bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)).

**Tab. 26: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der Untereinheiten der beiden Betainreduktasen bei Wachstum mit Betain und Ethanol gewachsenen Zellen im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Betain und Ethanol dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose (Spalte 3) bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Spalte 4). Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n. b. nicht bekannt

ID	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis	
		vs. Frc	vs. H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
CLJU_c27740	Transkriptionsregulator, LysR Familie	7,1	6,2
CLJU_c27750	Protein mit unbekannter Funktion	7,2	6,2
CLJU_c27760	Protein mit unbekannter Funktion	7,0	6,1
CLJU_c27770	Betain-Reduktase Untereinheit C $\alpha$	7,3	6,4
CLJU_c27780	Betain-Reduktase Untereinheit C $\beta$	7,4	5,5
CLJU_c27790	Betain-Reduktase Untereinheit A2	7,3	6,1
CLJU_c27800	Thioredoxin	7,7	6,9
CLJU_c27810	Thioredoxin-Reduktase	7,6	6,7
CLJU_c27820	Cholin/Carnitin/Betain Transporterprotein	8,0	6,9
CLJU_c27830	Betain-Reduktase Untereinheit B $\gamma$	8,0	6,6
CLJU_c27840	Betain-Reduktase Untereinheit B $\alpha$	8,1	6,7
CLJU_c27290	Betain-Reduktase Untereinheit C $\alpha$	1,2	n.b.
CLJU_c27300	Betain-Reduktase Untereinheit C $\beta$	0,3	n.b.
CLJU_c27310	Betain-Reduktase Untereinheit A2	6,9	4,0
CLJU_c27320	Thioredoxin	6,7	4,4
CLJU_c27330	Thioredoxin-Reduktase	0,3	n.b.
CLJU_c27340	Cholin/Carnitin/Betain Transporterprotein	0,1	n.b.
CLJU_c27350	Betain-Reduktase Untereinheit B $\gamma$	0,4	n.b.
CLJU_c27360	Betain-Reduktase Untereinheit B $\alpha$	0,9	n.b.

Wie man in Tab. 26 sehen kann, wird bei Anwesenheit von Betain das Cluster CLJU\_c27770 – CLJU\_c27840 sehr stark induziert, die Gene der zweiten Betain-Reduktase jedoch nicht. Die Ausnahmen bilden CLJU\_c27310 und CLJU\_c27320. Hier scheint auch eine starke Expression der beiden Gene vorzuliegen. Jedoch handelt es sich hierbei vermutlich um Artefakte. Diese beiden Gene sind mit 477 bp (CLJU\_c27310) und 324 bp (CLJU\_c27320) die kürzesten ORFs und haben zu ihren Homologen/Paralogen eine 89%ige bzw. 81%ige Ähnlichkeit auf DNA-Ebene, so dass es hier schwierig ist, für die Gene DNA-Oligonukleotidsonden zu erstellen, die in ihrer Länge von ca. 70 Basen eine möglichst geringe Ähnlichkeit zu den Sonden der homologen/paralogen Gene haben. Ein weiterer Punkt, der dafür spricht, ist die Stärke der Fluoreszenzsignale, die bei CLJU\_c27310 und CLJU\_c27320 jeweils ca. 10 – 30% der Stärke der Signale der zugehörigen Sonden von CLJU\_c27790 bzw. CLJU\_c27800 besitzen. Die markierten cDNA-*probes* von CLJU\_c27790 bzw. CLJU\_c27800 könnten auch an die Sonden von CLJU\_c27310 bzw. CLJU\_c27320 hybridisieren und durch die hohe Sequenzähnlichkeit nicht vollständig durch das Waschen entfernt werden. Zusätzlich ist *downstream* der induzierten Betain-Reduktase in einem Abstand von drei Genen ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie (CLJU\_c27740). Auch die Expression dieses Regulators und der zwei Gene unbekannter Funktion (CLJU\_c27750 - 60) ist signifikant erhöht bei Wachstum auf Betain und Ethanol.

### **Oxidation von Ethanol zu Acetat**

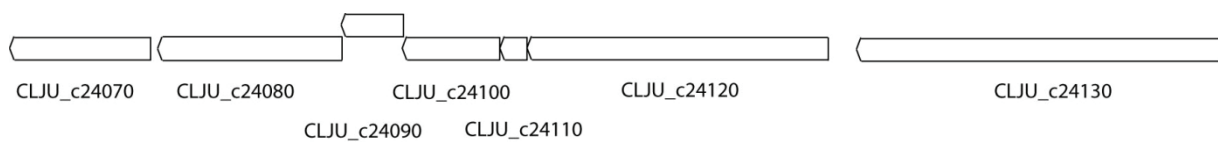
Ethanol wird über zwei Reaktionsschritte zu Acetat oxidiert. Im ersten Schritt wird die Reaktion von Ethanol zu Acetaldehyd von Alkohol-Dehydrogenasen katalysiert. Dabei werden Elektronen und Protonen auf den Co-Faktor NAD(P) übertragen. NAD(P)H wird mittels der Thioredoxin-Reduktase wieder regeneriert. Durch Transkriptionsanalysen konnten mehrere Alkohol-Dehydrogenasen identifiziert werden, deren Genexpression bei Wachstum auf Betain/Ethanol gegenüber den anderen beiden Bedingungen erhöht ist (siehe Tab. 27). In einem zweiten Schritt wird der toxische Acetaldehyd zu Acetat oxidiert. Diese Reaktion wird durch Aldehyd-Oxidoreduktasen katalysiert. Durch die Genomanalyse konnten zwei Aldehyd-Oxidoreduktasen – CLJU\_c21210, eine Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase, und CLJU\_c24130 – identifiziert werden, die in allen Experimenten eine erhöhte Expression bei auf Betain/Ethanol gewachsenen Zellen aufweisen (siehe Tab. 27).

**Tab. 27: Expressionsverhältnisse der regulierten Gene zur Oxidation von Ethanol zu Acetat bei Wachstum mit Betain und Ethanol gewachsenen Zellen im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Betain und Ethanol dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose (Spalte 3) bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Spalte 4). Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n. b. nicht bekannt

ID	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis	
		vs. Frc	vs. H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
CLJU_c23220	Zn-haltige Alkohol-Dehydrogenase	2,6	4,0
CLJU_c24880	NAD(P)H-abhängige Fe-Alkohol-Dehydrogenase	-*	5,2
CLJU_c24860	Zn-haltige Alkohol-Dehydrogenase	3,8	3,7
CLJU_c39950	NAD(P)H-abhängige Fe-Alkohol-Dehydrogenase	3,9	2,0
CLJU_c24130	Aldehyd-Oxidoreduktase	6,4	5,1
CLJU_c20210	Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase	2,1	2,0

\* Dieses Gen war bei den Experimenten unterschiedlich reguliert

Das Gen CLJU\_c24130 ist im Genom mit sechs anderen ORFs lokalisiert, die ebenfalls bei Wachstum mit Betain und Ethanol eine erhöhte Genexpression aufweisen (siehe Abb. 29).



**Abb. 29: Schematische Anordnung der ORFs CLJU\_c24070 – CLJU\_c24130 im Genom von *C. ljungdahlii*.** Mögliche Funktion der Gene sind in Tab. 28 aufgeführt.

Keinem dieser Gene kann eine eindeutige Funktion zugewiesen werden. Bei einer Analyse der Domänen konnte jedoch eine mögliche Fe-S-Oxidoreduktase (CLJU\_c24120) und eine mögliche Typ 11-Methyltransferase (CLJU\_c24100) identifiziert werden. Die Gene mit einer möglichen Funktion und die Expressionsverhältnisse sind in Tab. 28 dargestellt.

## Ergebnisse

**Tab. 28: Expressionsverhältnisse der Gene CLJU\_c24070 - CLJU\_c24130 bei Wachstum mit Betain und Ethanol gewachsenen Zellen im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Betain und Ethanol dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose (Spalte 3) bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Spalte 4). Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n. b. nicht bekannt

ID	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis	
		vs. Frc	vs. H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
CLJU_c24070	mögliches Protein mit Rossmann-Domäne	4,6	4,1
CLJU_c24080	mögliches Protein mit Radical SAM-Domäne	5,1	4,6
CLJU_c24090	unbekanntes Protein mit CGCAxxGCC-Motiv	5,1	4,2
CLJU_c24100	mögliche S-Adenosyl-L-Methionin-abhängige Methyltransferase	5,6	4,1
CLJU_c24110	hypothetisches Protein	5,8	5,3
CLJU_c24120	mögliche Fe-S Oxidoreduktase	6,3	4,7
CLJU_c24130	mögliche Aldehyde-Oxidoreduktase	6,8	5,1

### Selenoproteinbiosynthese

Im Genom sind zwei Sets von Genen, die in die Selenoproteinbiosynthese involviert sind (3.1.9). Davon ist ein Set der Gene (CLJU\_c07460 – CLJU\_c07480) immer auf einem basalen Level exprimiert und scheint keiner Regulation zu unterliegen. Das zweite Cluster ist nur drei Gene entfernt von der induzierten Betainreduktase und ist während des Wachstums auf Betain und Ethanol auch ähnlich stark induziert. Die Expressionsverhältnisse der Gene der Selenocysteinbiosynthese sind in Tab. 29 aufgelistet. Im Genom sind außerdem zwei Selenocystein-tRNAs kodiert, wobei keine Aussage über die Expression der tRNAs gemacht werden kann.

**Tab. 29: Expressionsverhältnisse der Gene der bei Wachstum mit Betain und Ethanol gewachsenen Zellen im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Betain und Ethanol dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose (Spalte 3) bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Spalte 4). Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n. b. nicht bekannt

ID	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis	
		vs. Frc	vs. H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
CLJU_c27700	Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor ( <i>selB</i> )	6,0	3,6
CLJU_c27710	Selenocystein-Synthase ( <i>selA</i> )	7,2	6,7
CLJU_c27720	Selenophosphat-Synthetase ( <i>selD</i> )	6,7	6,0
CLJU_c27730	Selenocystein-Lyase	6,9	5,8
CLJU_c07460	Selenophosphat-Synthetase ( <i>selD</i> )	0,2	-0,1
CLJU_c07470	Selenocystein-Synthase ( <i>selA</i> )	0,4	0,1
CLJU_c07480	Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor ( <i>selB</i> )	0,4	0,3

### Expression der Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs

Während des Abbaus von Betain und Ethanol entsteht kein CO<sub>2</sub>. Bei einem Vergleich der Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs mit der Expression von auf Fruktose oder H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) gewachsenen Zellen zeigte sich, dass die Gene für die Hydrogenasen, Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase keine Regulation aufweisen. Die Gene, die jedoch zusammen in einem großen Cluster organisiert sind, zeigen gegenüber beiden Vergleichsbedingungen eine geringere Genexpression (siehe Tab. 30). Außerdem konnte eine leicht erhöhte Expression einer der drei Formiat-Dehydrogenasen bei autotrophem Wachstum festgestellt werden. Einen Unterschied im Vergleich der beiden Referenzbedingungen stellt die anaerobe CO-Dehydrogenase (CLJU\_c09090-110) dar, die bei autotroph gewachsenen Zellen eine erhöhte Expression zeigen. Im Vergleich zu auf Fruktose gewachsenen Zellen zeigt sich keine einheitliche Regulation, sodass hier keine Aussage getroffen werden kann.

## Ergebnisse

**Tab. 30: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs und der Hydrogenasen bei Wachstum mit Betain und Ethanol gewachsenen Zellen im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Betain und Ethanol dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose (Spalte 3) bzw. H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Spalte 4). Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n. b. nicht bekannt

ID	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis	
		vs. Frc	vs. H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
CLJU_c06990	Formiat-Dehydrogenase (Selenoprotein)	0,7	0,5
CLJU_c08930	Formiat-Dehydrogenase	0,9	-1,1
CLJU_c20040	Formiat-Dehydrogenase (Selenoprotein)	0,7	-0,1
CLJU_c37530	Protein mit einer Ferredoxin-Domäne	-1,8	-1,4
CLJU_c37540	Glycine cleavage System H Protein	-1,7	-1,6
CLJU_c37550	CODH/ACS β- Untereinheit	-1,4	-1,8
CLJU_c37560	CODH/ACS Methyltransferase	-1,5	-1,8
CLJU_c37570	CODH/ACS γ- Untereinheit	-1,6	-1,7
CLJU_c37580	CODH/ACS δ- Untereinheit	-1,6	-1,8
CLJU_c37590	Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH/ACS	-1,4	-1,6
CLJU_c37600	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase	-1,5	-1,9
CLJU_c37610	Methylen-THF-Reduktase	-1,5	-1,7
CLJU_c37620	Mögliche kl. Untereinheit der Methylen-THF-Reduktase, Zinkfinger-Bindemotiv	-1,5	-1,7
CLJU_c37630	Methylen-THF-Dehydrogenase/Methenyl-THF-Cyclohydrolase	-1,6	-2,1
CLJU_c37640	Formyl-THF-Cyclohydrolase	-1,7	-2,0
CLJU_c37650	Formiat-THF-Ligase	-1,5	-2,2
CLJU_c37660	Hilfsprotein zur Nickel-Insertion in die CODH/ACS	-1,6	-2,3
CLJU_c37670	CODH/ACS α -Untereinheit	-1,5	-2,5
CLJU_c12770	Phosphotransacetylase	-0,1	0,2
CLJU_c12780	Acetat-Kinase	0,1	0,3
CLJU_c09090	FAD/NAD-abhängige Oxidoreduktase-Untereinheit	-*	-3,2
CLJU_c09100	Elektronentransfer-Untereinheit	-*	-3,2
CLJU_c09110	katalytische Untereinheit	-*	-3,1
CLJU_c07070	Fe-Fe-Hydrogenase 2	0,7	-0,4
CLJU_c07080	Fe-S-cluster-haltige Hydrogenase Komponent 2	0,6	-0,9
CLJU_c14700	Fe-haltige Hydrogenase	n.b.	n.b.
CLJU_c17270	Elektronentransportprotein	0,2	0,0
CLJU_c17280	Fe-Fe-Hydrogenase 2	0,2	0,3
CLJU_c28660	Ni-Fe-Hydrogenase 1, große Untereinheit	n.b.	n.b.
CLJU_c28670	Ni-Fe-Hydrogenase 1, kleine Untereinheit	n.b.	n.b.

\* Dieses Gen war bei den Experimenten unterschiedlich reguliert



### 3.2.5.3. Verifizierung der Ergebnisse der Transkriptionsanalysen durch *real-time* RT-PCR

Für einige ausgewählte Gene wurden die Ergebnisse, die mit den DNA-Microarray gewonnen wurden, durch *real-time* RT-PCR als zweite Methode verifiziert. Für diese Analysen wurde ebenfalls RNA aus jeweils zwei unabhängigen Kulturen gewonnen. Verglichen wurde die Genexpression von auf Betain und Ethanol gewachsenen Kulturen gegen solche, die auf Fruktose angezogen wurden. Die Werte der *real-time* RT-PCR der einzelnen Gene wurden auf die jeweilige Expression von drei *housekeeping*-Gene (*mutS2* (CLJU\_c21820), *ruvB* (CLJU\_c33820) und *hup* (CLJU\_c41670)) bezogen, die bei beiden Bedingungen jeweils gleich exprimiert werden sollten. Diese Gene wurden anhand der Microarray-Experimente ausgewählt. Die Expressionsverhältnisse wurden, wie in 2.8.3 beschrieben, berechnet. Die *real-time* RT-PCR-Experimente bestätigten die Ergebnisse aus den DNA-Microarrays. So konnte verifiziert werden, dass Gene, die in die Stickland-ähnlichen Reaktion involviert sind wie die B  $\gamma$ -Untereinheit der Betain-Reduktase (CLJU\_c27830) oder *adh2* (CLJU\_c39950), eine erhöhte Expression bei Wachstum auf Betain und Ethanol aufweisen. Gleiches konnte für die Selenocystein-Synthase (CLJU\_c27710) beobachtet werden. Auf der anderen Seite konnte eine verringerte Expressionsrate bei Genen des Wood-Ljungdahl-Wegs (*acsA* und *metF*) ebenso gezeigt werden, wie bei Genen der Glykolyse (*pyk* und *gap*) und des PTS-Systems (IIABC). Die Ergebnisse sind in Tab. 31 zusammengefasst.

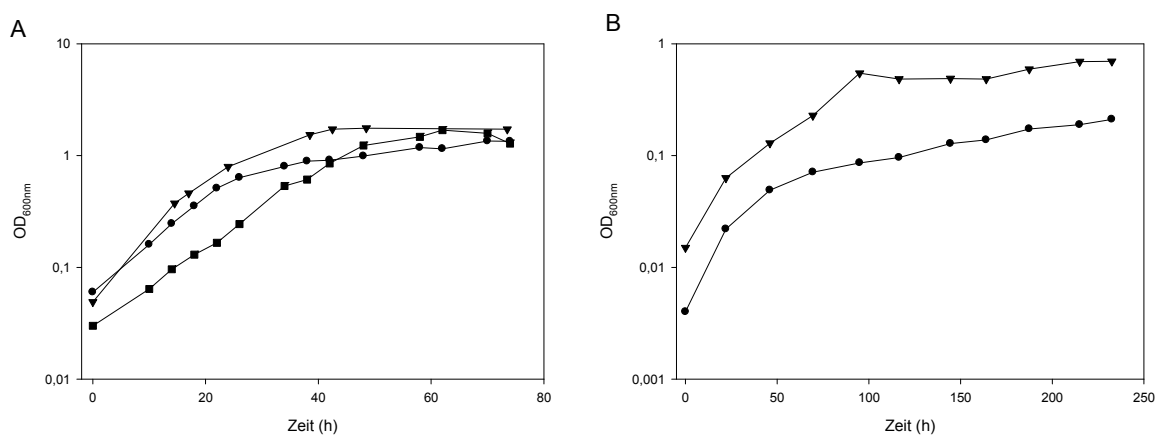
**Tab. 31: Expressionsverhältnisse von ausgewählten Genen bei Wachstum auf Betain und Ethanol im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose ermittelt durch DNA-Microarray-Technologie und *real-time* RT-PCR.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Betain und Ethanol dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei (DNA-Microarray) bzw. zwei (*real-time* RT-PCR) Experimenten dar.

ID	Funktion	log Expressionsverhältnisse Betain/Ethanol vs. Fruktose	
		DNA-Microarray	<i>real-time</i> RT-PCR
CLJU_c37670	<i>acsA</i> CODH/ACS $\alpha$ -Untereinheit	-1,5	-1,4
CLJU_c03260	<i>pyk</i> Pyruvat-Kinase	-4,6	-5,0
CLJU_c39150	<i>gap</i> Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	-5,4	-5,9
CLJU_c20590	PTS-System Untereinheit IIABC	-3,1	-2,7
CLJU_c27830	Betain-Reduktase Untereinheit B $\gamma$	8,0	6,1
CLJU_c27710	<i>selA</i> Selenocystein-Synthase	7,2	6,5
CLJU_c39950	<i>adh2</i> NAD(P)-abhängige Fe-haltige Alkohol-Dehydrogenase	3,9	4,0
CLJU_c41670	<i>hup</i> DNA-Bindeprotein	0,32	0,45
CLJU_c33820	<i>ruvB</i> Holliday junction DNA Helicase	0,26	-0,45
CLJU_c21820	<i>mutS2</i> DNA mismatch Reparaturprotein	0,04	0,65

### 3.2.6. Verwertung verschiedener Stickstoffverbindungen

Im Genom konnten verschiedene Systeme identifiziert werden, durch die der Organismus Stickstoffverbindungen aufnehmen und verwerten kann (3.1.5). Um zu überprüfen, welche N-Quellen verwertet werden können, wurde *C. ljungdahlii* in Medium mit Fruktose als C-Quelle und verschiedenen N-Quellen kultiviert. Die verschiedenen N-Quellen waren Ammonium, Nitrat und Harnsäure. Der Organismus wurde zusätzlich in Medium kultiviert, im dem bis auf molekularen N<sub>2</sub> aus der Atmosphäre keine N-Quelle war. Hier konnte jedoch kein Wachstum beobachtet werden, obwohl im Genom Gene für eine Molybdän-abhängige Nitrogenase (CLJU\_c04900-80; CLJU\_c23510-40) identifiziert werden konnten. *C. ljungdahlii* konnte jedoch auf den anderen drei N-Quellen kultiviert werden und zeigte jeweils ein ähnliches Wachstumsverhalten und erreichte eine ähnliche End-OD<sub>600</sub> von 1,7 - 2,0. Zusätzlich wurde das autotrophe Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (50%/50% (v/v)) mit NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bzw. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> als N-Quelle getestet. Dabei konnte mit NO<sub>3</sub><sup>-</sup> eine höhere Zelldichte erreicht werden als mit NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (siehe Abb. 30). Da Harnsäure gleichzeitig als C-Quelle dienen kann

(Barker & Beck, 1941), wurde getestet, ob *C. ljungdahlii* mit Harnsäure als N- und C-Quelle wachsen kann. Dabei konnte kein Wachstum beobachtet werden. Auch verschiedene Kombinationen mit anderen Substraten wie Citrat oder Ethanol wurden getestet. Dabei war festzustellen, dass der Organismus auf einer Mischung von Harnsäure und Ethanol zwar kein Wachstum zeigte, jedoch wurden Sporen gebildet, so dass man aus dieser Kultur auch nach 3 Monaten bis 1 Jahr noch frisches Medium animpfen konnte, so dass der Organismus wieder angewachsen ist. Bei Wachstum auf Medium mit Fruktose als C-Quelle musste die Kultur nach 2 – 3 Tagen überimpft werden, da die Zellen nach dieser Zeit abstarben.



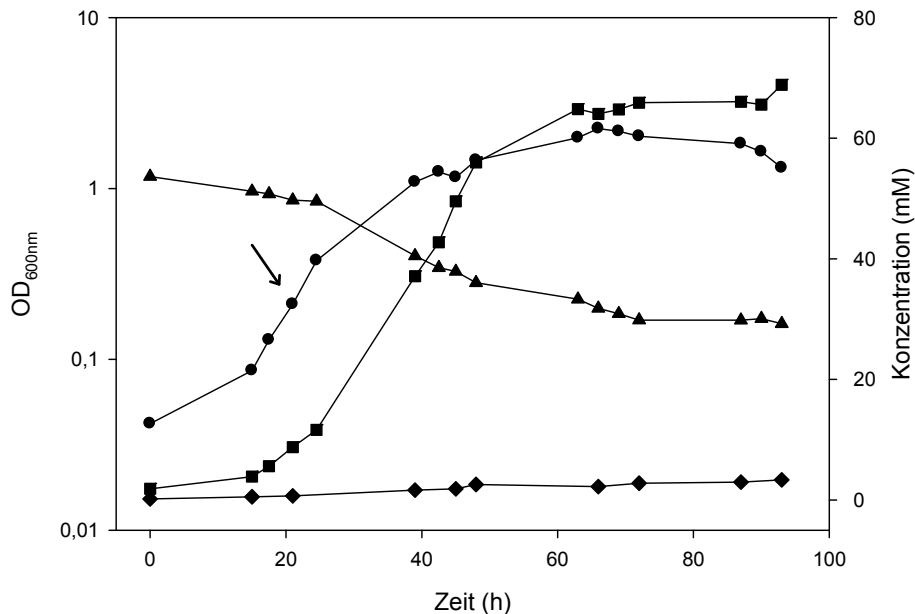
**Abb. 30: Wachstum von *C. ljungdahlii* mit verschiedenen N-Quellen:** Ammonium (●), Nitrat (▼) bzw. Harnsäure (■); A: Wachstum mit Fruktose als C-Quelle; B: Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessungen.

### 3.2.7. Verwertung verschiedener Zucker

#### 3.2.7.1. Wachstum auf Fruktose

*C. ljungdahlii* kann heterotroph auf Fruktose als Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen und erreicht Zelldichten bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 2,0 – 2,2. Die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  beträgt 0,15 h<sup>-1</sup> und die daraus resultierende Verdopplungszeit  $t_D$  4,5 h. Dabei fällt der pH-Wert des Mediums vom Ausgangswert von 5,6 auf knapp unter 4. Der Organismus verbraucht ca. 23 mM Fruktose und produziert etwa 66 mM Acetat und 3 – 5 mM Ethanol (siehe Abb. 31). Also werden aus 1mol Fruktose ca. 3mol Acetat und als Nebenprodukt geringe Mengen Ethanol produziert. Dies stimmt mit theoretischen Überlegungen überein:

Als homoacetogener Organismus kann *C. ljungdahlii* aus 1 mol Fruktose 3 mol Acetat herstellen. 2 mol Acetat werden im Anschluss zur Glykolyse bei der Decarboxylierung von Pyruvat produziert. Die dabei entstehenden 2 Moleküle CO<sub>2</sub> können via des Wood-Ljungdahl-Wegs zu einem weiteren mol Acetat konvertiert werden.



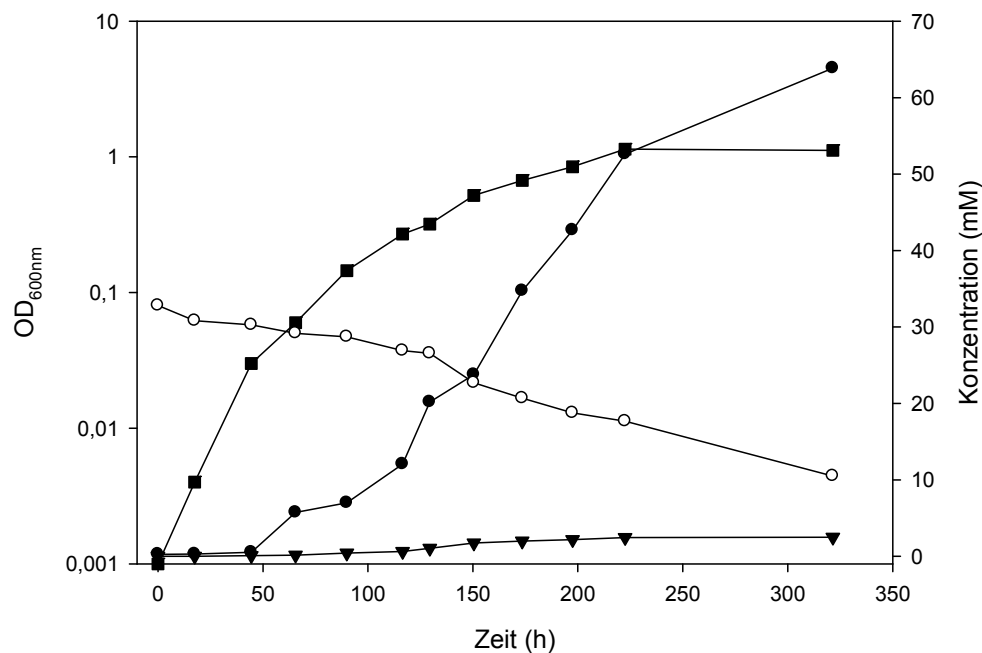
**Abb. 31: Wachstum von *C. ljungdahlii* mit Fruktose als C-Quelle:** Dargestellt ist neben dem Wachstum von *C. ljungdahlii* (●) und dem Verbrauch von Fruktose (▲), die Bildung von Acetat (■) und Ethanol (◆). Der Pfeil zeigt exemplarisch den Zeitpunkt, an dem Zellen für die Transkriptionsanalyse geerntet werden. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Abbildung zeigt eine repräsentative Einzelmessung.

### 3.2.7.2. Wachstum auf Glukose

Neben Fruktose kann *C. ljungdahlii* auch auf Glukose als C<sub>6</sub>-Zucker wachsen. Um auf diesem Substrat als Energie- und Kohlenstoffquelle kultiviert werden zu können, benötigt der Organismus jedoch eine Adaptionzeit von 2-6 Wochen, um zuverlässig zu wachsen. Danach werden ähnliche Zelldichten wie auf Fruktose erreicht (OD<sub>600</sub> = 1,5 – 2,0), jedoch sind die Wachstumsraten mit  $\mu_{\max}$  von 0,04 h<sup>-1</sup> und einer Verdopplungszeit von 18 h signifikant geringer als bei Wachstum mit Fruktose.

### 3.2.7.2.1. Bestimmung von Fermentationsprodukten

Das Wachstum erfolgte in PETC-Medium mit ca. 30 mM Glukose als Kohlenstoffquelle bei 37°C. Analysen der Kulturüberstände, die über den Wachstumsverlauf genommen wurden, ergaben einen Verbrauch von Glukose von ca. 22 mM Glukose und eine Produktion von etwa 63 mM Acetat und 2-3 mM Ethanol (siehe Abb. 32). Die Messungen der Glukose- und Acetatkonzentrationen wurden mittels Ionenchromatographie durchgeführt, die Mengen an Ethanol wurden über Gaschromatographie ermittelt. Mittels GC/MS konnte als weiteres Produkt Glykolsäure (Hydroxyacetat) ermittelt werden, jedoch konnte diese Substanz nicht über IC oder GC quantifiziert werden, da auch durch Veränderung der IC-Parameter (Addition von 15% Methanol zu Eluenten als Endkonzentration) keine Auftrennung von Acetat und Glykolat erreicht werden konnte.



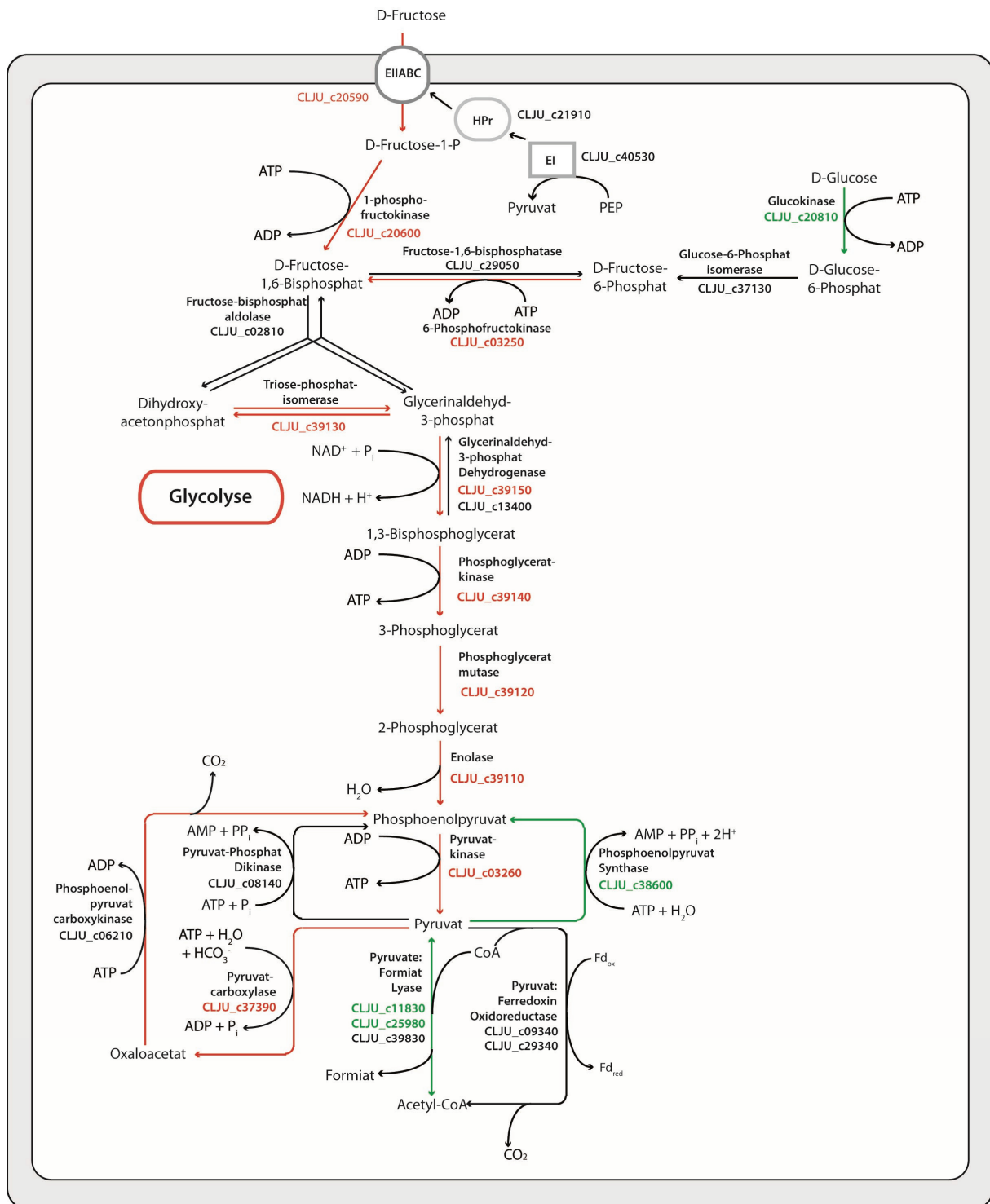
**Abb. 32: Wachstum von *C. ljungdahlii* mit Glukose:** Dargestellt ist neben dem Wachstum von *C. ljungdahlii* (■) und dem Verbrauch von Glukose (○), die Bildung von Acetat (●) und Ethanol (▼). Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Abbildung zeigt eine repräsentative Einzelmessung.

### 3.2.7.2.2. Transkriptionsanalysen bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zu Wachstum auf Fruktose

Da *C. ljungdahlii* einige Unterschiede bei einem Wachstum auf Glukose im Vergleich zu einem Wachstum auf Fruktose zeigt, wurden auch hier Transkriptionsanalysen durchgeführt. Dabei wurde die Genexpression von auf Glukose kultivierten Zellen gegen auf Fruktose gewachsene Zellen als Referenzbedingung untersucht. Es wurden bei drei unabhängigen biologischen Experimenten jeweils RNA aus Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

#### **Expression der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und des Pyruvatmetabolismus**

Das Hauptaugenmerk der Transkriptionsanalysen lag zunächst auf den Unterschieden in der Regulation der Glykolyse und des Pyruvat-Stoffwechsels. Ein Schema der Transkriptionsergebnisse dafür sind in Abb. 33, die Expressionsverhältnisse und die beteiligten Gene sind in Tab. 32 dargestellt.



**Abb. 33: Schematische Darstellung der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und Pyruvat-Metabolismus;** Angegeben sind die an den Reaktionen beteiligten Gene. Grüne Pfeile und Gennummern stellen eine erhöhte Genexpression bei Verwertung von Glukose dar, rote Pfeile eine entsprechend höhere Genexpression bei Wachstum mit Fruktose. Die Funktionen der Gene und ihre Expressionsverhältnisse sind in Tab. 32 angegeben.

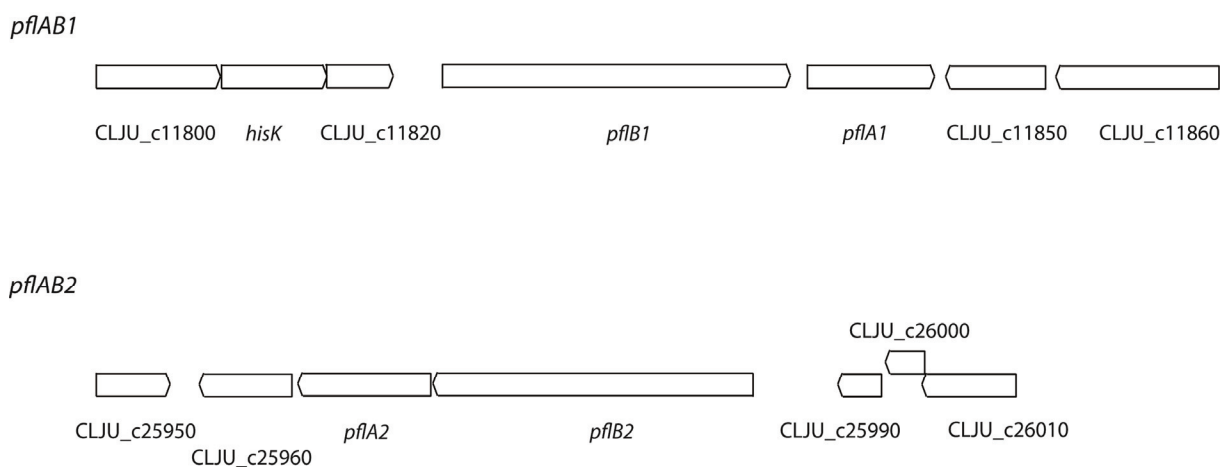
## Ergebnisse

**Tab. 32: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der beteiligten Gene der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und des Pyruvatmetabolismus bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Glukose dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar. n. b. nicht bestimmt

<b>ID</b>	<b>Gen</b>	<b>Funktion/Annotation</b>	<b>log- Expressions- verhältnis</b>
<b>Gene der Glykolyse</b>			
CLJU_c20810		Transkriptionsregulator/Glucokinase	7,0
CLJU_c37130	<i>pgi</i>	Glukose-6-Phosphat-Isomerase	-0,3
CLJU_c03250	<i>pfk</i>	6-Phosphofruktokinase	-1,3
CLJU_c03260	<i>pyk</i>	Pyruvat-Kinase	-1,5
CLJU_c39110	<i>eno</i>	Enolase	-2,3
CLJU_c39120	<i>pgm</i>	2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase	-2,4
CLJU_c39130	<i>tim</i>	Triosephosphat-Isomerase	-1,9
CLJU_c39140	<i>pgk</i>	Phosphoglycerat-Kinase	-2,0
CLJU_c39150	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	-1,5
CLJU_c39160		möglicher Transkriptionsregulator	-2,4
CLJU_c02810	<i>fba</i>	Fruktose-bisphosphat-Aldolase	0,0
CLJU_c13400	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	-0,1
<b>Pyruvat-Metabolismus</b>			
CLJU_c37390	<i>pyc</i>	Pyruvat-Carboxylase	-2,9
CLJU_c06210	<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	-1,6
CLJU_c09340	<i>pfor</i>	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	-0,1
CLJU_c29340	<i>pfor</i>	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	n.b.
CLJU_c08140	<i>ppdK</i>	Pyruvat-Phosphat-Dikinase	-0,1
CLJU_c38600	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvat-Synthase	1,3
CLJU_c11830	<i>pfl1</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	7,8
CLJU_c11840		mögliches Aktivierungsenzym der Pyruvat:Formiat-Lyase	6,5
CLJU_c25970		mögliches Aktivierungsenzym der Pyruvat:Formiat-Lyase	3,7
CLJU_c25980	<i>pfl2</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	5,6
CLJU_c39820		mögliches Aktivierungsenzym der Pyruvat:Formiat-Lyase	-0,6
CLJU_c39830	<i>pfl3</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	-0,3
<b>PTS-System</b>			
CLJU_c40530		Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase	-0,2
CLJU_c21910	<i>HPr</i>	mögliche HPr Kinase/Phosphorylase	0,5
CLJU_c20590		Fruktose-spezifisches PTS system, IIABC Komponente	-4,6
CLJU_c20600	<i>fruB</i>	1-Phosphofruktokinase	-3,6
CLJU_c20610		Transkriptionsregulator, DeoR Familie	-3,8



Obwohl Glukose und Fruktose Hexosen sind und als solche ineinander umgewandelt werden können, sind Gene der Glykolyse unterschiedlich reguliert. Dabei zeigt sich, dass die Gene der Glykolyse, die in zwei Operons organisiert sind, bei auf Fruktose gewachsenen Zellen stärker exprimiert werden als bei auf Glukose gewachsenen Zellen. Jedoch ist ein Transkriptionsregulator mit Glucokinase-Domäne sehr stark bei Wachstum auf Glukose hochreguliert. Die Glucokinase phosphoryliert die Glukose zu Glukose-6-Phosphat, das wiederum durch die Glukose-6-Phosphat-Isomerase zu Fruktose-6-Phosphat umgelagert werden kann. Dieses Gen weist keine Regulation der Genexpression in beiden Bedingungen auf. Des Weiteren sind die Gene des PTS-Systems bei Wachstum auf Glukose nicht induziert. Zum Abbau von Pyruvat stehen *C. ljungdahlii* verschiedene Systeme zur Verfügung, die in Tab. 32 aufgeführt sind. Eine Regulation konnte bei verschiedenen dieser Gene festgestellt werden. Eine erhöhte Genexpression bei Wachstum auf Fruktose konnte bei der Pyruvat-Carboxylase, die Oxaloacetat aus Pyruvat und CO<sub>2</sub> synthetisiert, und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, die Oxaloacetat unter ATP-Verbrauch zu Phosphoenolpyruvat decarboxyliert, festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigen zwei ORFs (CLJU\_c11830 und CLJU\_c25980), die als Pyruvat-Formiat-Lyasen identifiziert wurden, eine deutlich erhöhte Genexpression bei Wachstum auf Glukose. Eine dritte Kopie dieses Gens (CLJU\_c39830) zeigt jedoch keine Regulation bei einem Vergleich der beiden Bedingungen. Direkt neben jeder Kopie des Enzyms ist jeweils ein mögliches Aktivierungsenzym gefunden worden, dessen Regulation der der zugehörigen Pyruvat:Formiat-Lyase folgt. Die Genumgebung der regulierten Pyruvat:Formiat-Lyasen werden in Abb. 34 dargestellt.



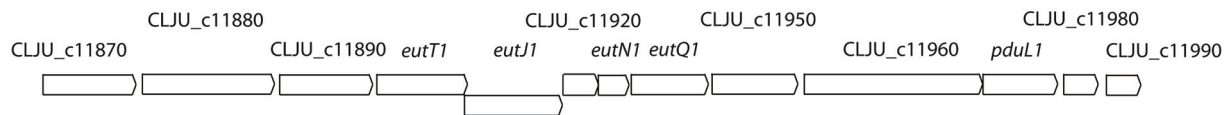
**Abb. 34: Schematische Anordnung der regulierten Pyruvat:Formiat-Lyasen *pflAB* und der angrenzenden Gene im Genom von *C. ljungdahlii*.** Erläuterung im Text.

*Upstream* der Pyruvat:Formiat-Lyase *pflB1* und des aktivierendenden Enzyms *pflA1* liegt ein mögliches Operon mit einer putativen Permease (CLJU\_c11800), einer Histidinol-Phosphatase *hisK* und einem konservierten Protein (CLJU\_c11820), das im Vergleich der beiden Bedingungen nicht reguliert ist. *Downstream* von *pflAB1* liegen ein CheY-ähnlicher Response Regulator (CLJU\_c11850) und eine 2-Komponenten-Sensor Histidin-Kinase (CLJU\_c11860), die auf dem Gegenstrang kodiert und ebenfalls nicht reguliert sind. *Downstream* von *pflAB2* liegt das Gen CLJU\_c25960, das für eine Fruktose-6-Phosphat-Aldolase kodieren könnte. Eine Fruktose-6-Phosphat-Aldolase katalysiert die Spaltung von D-Fruktose-6-Phosphat in D-Glyceraldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton. Die Expression dieses Gens ist wie *pflAB2* auch bei Wachstum auf Glukose mit einem Wert von 5,6 sehr stark erhöht. Flankiert werden diese drei Gene *downstream*, aber auf dem Gegenstrang kodiert, durch ein mögliches Rubrerythrin (CLJU\_c25950). *Upstream* liegt ein mögliches Operon von ORFs mit nicht bekannter Funktion (CLJU\_c25990 - 610).

### **Expression der Gene für die Bildung einer Carboxysom-ähnlichen Struktur**

Viele Bakterien besitzen subzelluläre Organisationsstrukturen, die durch Proteine von der restlichen Zelle abgegrenzt sind und in denen spezifische Reaktionen oder Stoffwechselwege ablaufen können. Durch die Bildung dieser sogenannten Mikrokompartimente kann einerseits die Effizienz eines Stoffwechselweges durch Konzentrierung der Substrate, andererseits auch die Spezifität der Reaktionen erhöht werden (Yeates *et al.*, 2008).

Bei Wachstum auf Glukose konnte ein Cluster von Genen identifiziert werden, dass sehr stark induziert ist. In diesem Cluster sind Gene lokalisiert, die Ähnlichkeit zu Genen aus Ethanolamin- bzw. Propandioloperons aus *Salmonella* besitzen. Es sind Orthologe zu Genen für Shellproteine (*eutJNQ*) und eine B<sub>12</sub>-abhängige Methyltransferase (*eutT*) des Ethanolaminoperons vorhanden, ebenso für Gene des Propandioloperons (*pduB*, *pduL*) aus *Salmonella typhimurium* (Liu *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 1997). Die schematische Anordnung der Gene ist in Abb. 35 dargestellt, die zugehörigen potentiellen Funktionen mit den Expressionsverhältnissen sind in Tab. 33 aufgeführt.



**Abb. 35: Schematische Anordnung des bei Glukose hochregulierten Genclusters mit Genen für mögliche Mikrokompartmentproteinen.** Funktionen der abgebildeten Gene und ihre Expressionsverhältnisse sind in Tab. 33 aufgelistet.

**Tab. 33: Funktionen und Expressionsverhältnisse der Gene des Clusters zur möglichen Mikrokompartimentbildung bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Glukose dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis
CLJU_c11870	<i>pduB</i>	mögliches Protein zur Propandiolverwertung	7,4
CLJU_c11880		Alkohol-Dehydrogenase	8,3
CLJU_c11890		mögliches Aquaporin (major intrinsic protein)	7,6
CLJU_c11900	<i>eutT1</i>	mögliche B12-abhängige Adenosyltransferase	7,9
CLJU_c11910	<i>eutJ1</i>	mögliches Chaperonin	6,4
CLJU_c11920		mögliches Mikrokompartimentprotein	6,5
CLJU_c11930	<i>eutN1</i>	mögliches Mikrokompartimentprotein	-*
CLJU_c11940	<i>eutQ1</i>	mögliches Protein zur Ethanolaminverwertung	7,5
CLJU_c11950		mögliches Mikrokompartimentprotein	6,4
CLJU_c11960		Aldehyd-Dehydrogenase	6,2
CLJU_c11970	<i>pduL1</i>	mögliche Phosphotransacylase	6,3
CLJU_c11980		mögliches Mikrokompartimentprotein	6,3
CLJU_c11990		mögliches Mikrokompartimentprotein	6,3

\* Von diesem ORF gibt es keine Expressionsdaten, da keine Sonde auf dem Microarray vorhanden ist

Im Genom konnte ein zweites Cluster von Genen (CLJU\_c39700 – CLJU\_c39860) identifiziert werden, das große Ähnlichkeit zu dem auf Glukose verstärkt exprimierten Cluster hat. Neben anderen Genen sind Homologe von CLJU\_c11900 – CLJU\_c11990 mit einer Übereinstimmung von 93 – 100% auf DNA-Ebene in diesem Cluster enthalten (CLJU\_c39700 – CLJU\_c39750 und CLJU\_c39780 – CLJU\_c39810). Da die restlichen Gene dieses Clusters jedoch keine Änderung der Genexpression zeigen, ist dies ein starkes Indiz, dass dieses Cluster bei Wachstum auf Glukose nicht induziert wird.

### Expression der Gene des Pentose-Phosphat-Wegs inkl. Xylose-Operon

Bei Wachstum von *C. ljungdahlii* auf Glukose konnte bei einem Operon, verantwortlich für den Abbau von D-Xylose, eine sehr starke Änderung der Genexpression gegenüber Wachstum auf Fruktose festgestellt werden (siehe Tab. 34).

**Tab. 34: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse des Xylose-Operons inkl. Transkriptionsregulator bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Glukose dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

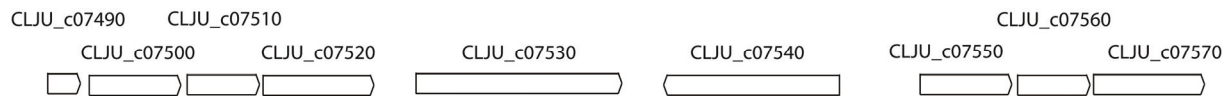
ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Xylose-Operon</b>			
CLJU_c18240	<i>xylA</i>	D-Xylose-Isomerase	9,4
CLJU_c18260	<i>xylB</i>	D-Xylose-Kinase	9,5
CLJU_c18270		mögliche Aldose-1-Epimerase	8,3
CLJU_c18280	<i>xylT</i>	Zuckertransporter	8,7
CLJU_c18290	<i>xylR</i>	Transkriptionsregulator	2,5

Neben den Genen zum Abbau von D-Xylose ist in diesem Operon eine Aldose-1-Epimerase lokalisiert, die ebenfalls mit einem Wert von 8,3 stark induziert ist. Im Genom konnte eine weitere Aldose-1-Epimerase identifiziert werden, die downstream des L-Arabinose-Operons liegt. Dieses Gen zeigt auch eine erhöhte Expression bei Kultivierung von *C. ljungdahlii* auf Glukose, jedoch mit einem Wert von 1,3 schwächer als CLJU\_c18270. Die Gene des Pentose-Phosphat-Wegs zeigen unter beiden Bedingungen ein Fluoreszenzsignal, unterliegen im Vergleich jedoch keiner Regulation.

### Methyltransferase-System

Die durchgeführten Transkriptionsanalysen zeigten bei Wachstum des Organismus auf Glukose eine erhöhte Genexpression von zwei Clustern von Genen, die sehr stark dem O-Demethylierungssystem in *M. thermoacetica* ähneln. Diese Cluster bestehen aus einer 5-Methyl-THF-Homocystein-Methyltransferase (CLJU\_c07500 bzw. CLJU\_c07550), einem Corrinoid-Protein (CLJU\_c07510 bzw. CLJU\_c07560) und einer Cobalamin-abhängigen Methyltransferase (CLJU\_c07520 bzw. CLJU\_c07570). Die beiden Cluster sind durch zwei

ORFs voneinander getrennt (siehe Abb. 36) und weisen beide eine erhöhte Genexpression bei Wachstum mit Glukose auf (siehe Tab. 35). Upstream des ersten Clusters liegt ein kleines hypothetisches Protein (CLJU\_c07490), das ebenfalls bei Wachstum auf Glukose eine erhöhte Genexpression aufweist.



**Abb. 36: Schematische Anordnung von zwei Methyltransferase-Systemen im Genom von *C. ljungdahlii*.** Mögliche Funktion der Gene und Expressionsverhältnisse sind in Tab. 35 aufgelistet.

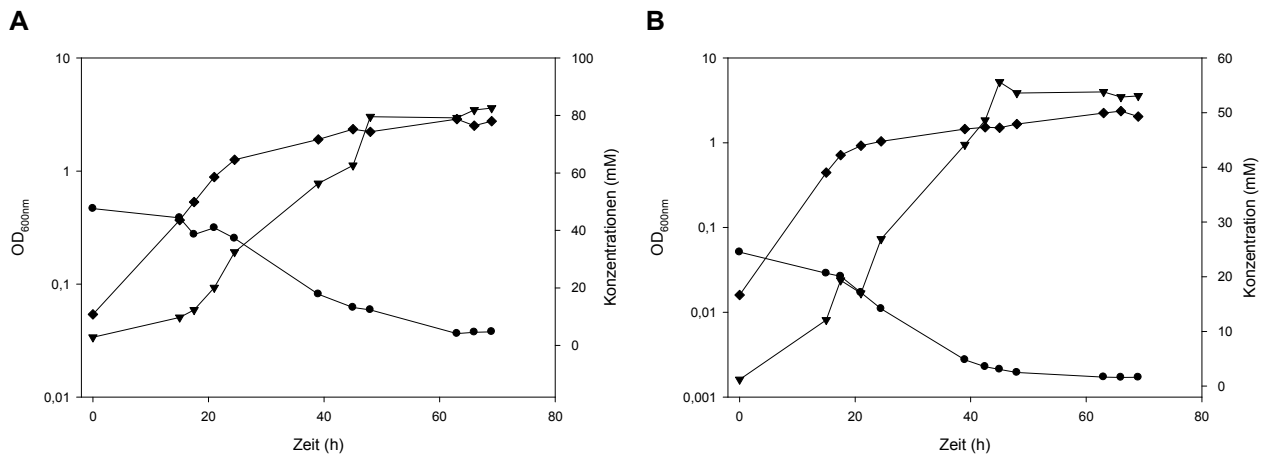
**Tab. 35: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der Genumgebung der beiden Gencluster für Methyltransferase-Systeme bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Glukose dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis
<b>Gene involviert in Methyltransferase-Systeme</b>		
CLJU_c07490	hypothetisches Protein	2,4
CLJU_c07500	putative Methyl-THF-Homocystein-Methyltransferase	2,2
CLJU_c07510	putatives Corrinoid-Protein	2,2
CLJU_c07520	putative Cobalamin-abhängigen Methyltransferase	2,2
CLJU_c07530	hypothetisches Protein	1,6
CLJU_c07540	hypothetisches Protein	0,2
CLJU_c07550	putative Methyl-THF-Homocystein-Methyltransferase	2,2
CLJU_c07560	putatives Corrinoid-Protein	2,2
CLJU_c07570	putative Cobalamin-abhängigen Methyltransferase	2,2

Die DNA-Sequenzen der homologen Gene der beiden Methyltransferase-Systeme sind zu 99 – 100% identisch, so dass man keine Aussage treffen kann, ob nur eines oder beide dieser Cluster eine erhöhte Genexpression bei Wachstum auf Glukose aufweisen bzw. welches Cluster reguliert ist.

### 3.2.7.3. Transkriptionsanalysen bei Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose

Neben den Hexosen Fruktose und Glukose kann *C. ljungdahlii* auch die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose verwerten. Bei beiden Zuckern erreicht der Organismus eine Zelldichte ( $OD_{600nm}$ ) von ca. 1,8 – 2,0. Das Hauptstoffwechselprodukt ist Essigsäure. In Abb. 37 ist der Verbrauch von D-Xylose bzw. L-Arabinose und die Bildung von Acetat in Abhängigkeit des Wachstums dargestellt.



**Abb. 37: Wachstum von *C. ljungdahlii* auf D-Xylose (Graph A) bzw. L-Arabinose (Graph B);** Dargestellt ist neben dem Wachstum von *C. ljungdahlii* (◆) der Verbrauch von D-Xylose bzw. L-Arabinose (●) und die Bildung von Acetat (▼). Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die Abbildung zeigt repräsentative Einzelmessung.

Im Genom konnten zwei Cluster identifiziert werden, die Gene für den Abbau von D-Xylose (CLJU\_c18240 - 290) bzw. L-Arabinose (CLJU\_c01200 - 20) kodieren (siehe 3.1.3.2). Um die Genexpression bei Verwertung eines C5-Zuckers zu untersuchen, wurden exemplarisch Transkriptionsanalysen bei Wachstum auf D-Xylose angefertigt. Es wurden aus einer exponentiell wachsenden Kultur Zellen geerntet und daraus RNA isoliert. Verglichen wurde die Genexpression mit auf Fruktose gewachsenen Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase als Referenzbedingung.

## Expression der Gene des Zentralstoffwechsels bei Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose

Die Transkriptionsanalysen zeigen einige Unterschiede in der Genexpression der zentralen Stoffwechselwege EMP-Weg und Pentose-Phosphat-Weg. Die Expression der Gene des Fruktose-spezifischen Phosphotransferase-Systems IIABC (CLJU\_c20590) und der 1-Phosphofruktokinase (CLJU\_c20600) ist bei Wachstum auf D-Xylose reduziert.

**Tab. 36: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse des PTS-Systems bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Glukose dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>PTS-System</b>			
CLJU_c40530		Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase	0,1
CLJU_c21910	<i>HPr</i>	predicted HPr Kinase/Phosphorylase	-0,5
CLJU_c20590		Fruktose-spezifisches PTS system, IIABC Komponente	-2,0
CLJU_c20600	<i>fruB</i>	1-Phosphofruktokinase	-3,0
CLJU_c20610		Transkriptionsregulator, DeoR Familie	-3,0

Die Gene der Glykolyse bzw. Gluconeogenese weisen mit Ausnahme einer alleinstehenden Kopie der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (CLJU\_c13400) mit einem Wert von -6,2 und der Fruktose-1,6-Bisphosphatase (CLJU\_c29050) mit einem Wert von -3,4 keine Regulation auf. Die Expression dieser beiden Gene ist bei Wachstum auf D-Xylose reduziert. Auch die Gene des Pentose-Phosphat-Wegs zeigen keine Unterschiede in der Expression. Jedoch sind die Gene eines Operons zur Verwertung von D-Xylose sehr stark exprimiert. Dieses Operon beinhaltet einen Transporter (CLJU\_c18260), eine D-Xylose-Isomerase (CLJU\_c18240), die die Isomerisation von D-Xylose zu D-Xylulose katalysiert, und eine Xylulose-Kinase (CLJU\_c18250), die diese unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Das entstandene D-Xylulose-5-Phosphat kann anschließend in den Pentose-Phosphat-Weg eingeschleust werden (siehe Abb. 38).

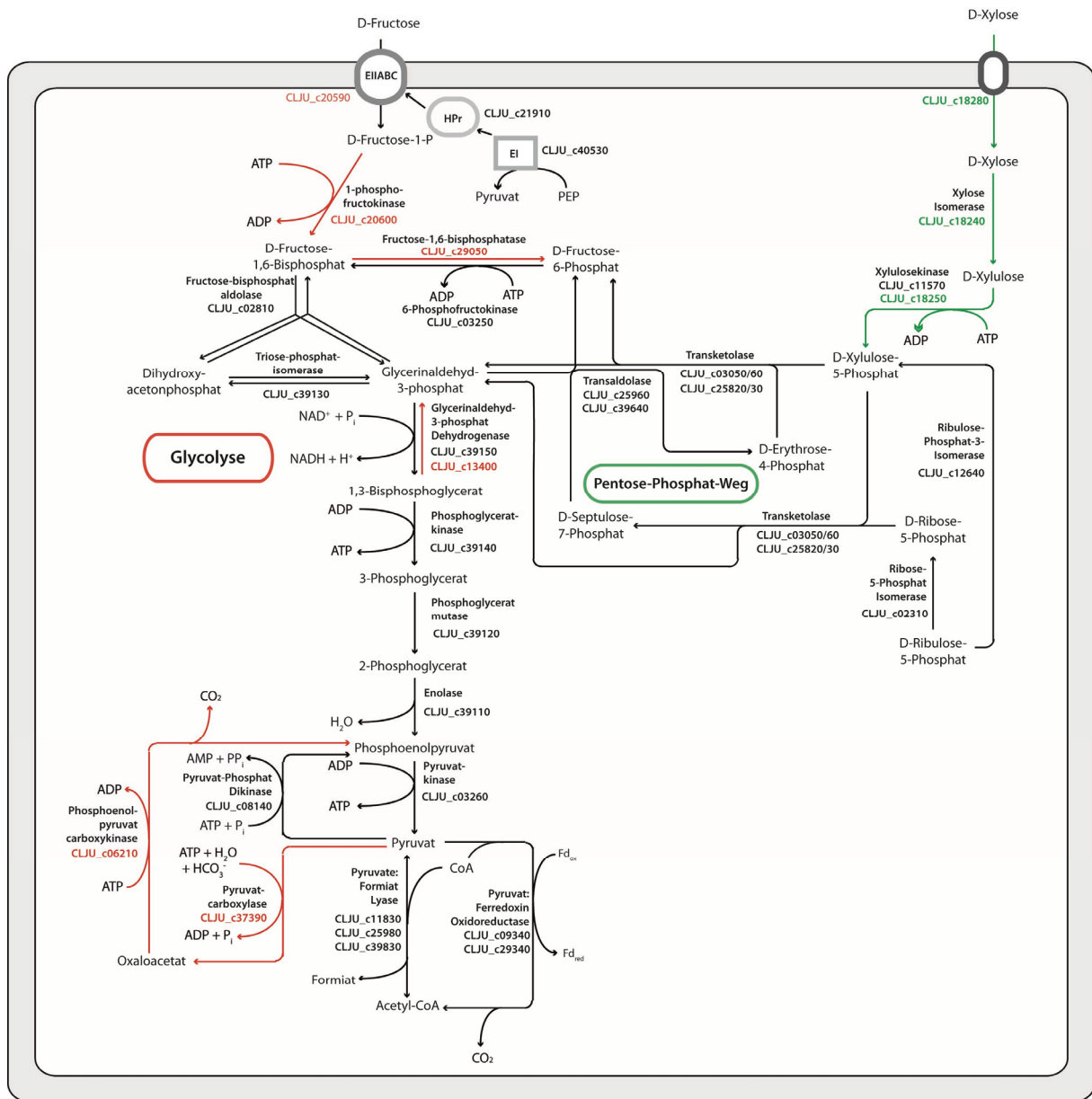


Abb. 38: Schematische Darstellung der Gene der Glykolyse, des Pentose-Phosphat-Wegs, Pyruvatmetabolismus und D-Xyloseabbaus; Angegeben sind die an den Reaktionen beteiligten Gene. Grüne Pfeile und Gennummern stellen eine erhöhte Genexpression bei Verwertung von Xylose dar, rote Pfeile eine entsprechend höhere Genexpression bei Wachstum mit Fruktose. Die Funktionen der Gene und ihre Expressionsverhältnisse sind in Tab. 37 und Tab. 38 angegeben.



**Tab. 37: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse der beteiligten Gene der Gene der Glykolyse, Gluconeogenese und des Pyruvatmetabolismus bei Wachstum auf D-Xylose im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit Glukose dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus zwei Experimenten dar. n.b. nicht bekannt

<b>ID</b>	<b>Gen</b>	<b>Funktion/Annotation</b>	<b>log- Expressions- verhältnis</b>
<b>Gene der Glykolyse</b>			
CLJU_c20810		Transkriptionsregulator/Glucokinase	0,0
CLJU_c37130	<i>pgi</i>	Glukose-6-Phosphat-Isomerase	-0,7
CLJU_c03250	<i>pfk</i>	6-Phosphofruktokinase	-0,6
CLJU_c03260	<i>pyk</i>	Pyruvat-Kinase	-0,5
CLJU_c39110	<i>eno</i>	Enolase	-0,5
CLJU_c39120	<i>pgm</i>	2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase	-0,3
CLJU_c39130	<i>tim</i>	Triosephosphat-Isomerase	-0,4
CLJU_c39140	<i>pgk</i>	Phosphoglycerat-Kinase	-0,3
CLJU_c39150	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	-0,2
CLJU_c39160		möglicher Transkriptionsregulator	-0,1
CLJU_c02810	<i>fba</i>	Fruktose-bisphosphat-Aldolase	-0,2
CLJU_c13400	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	-6,5
<b>Pyruvat-Metabolismus</b>			
CLJU_c37390	<i>pyc</i>	Pyruvat-Carboxylase	-1,3
CLJU_c06210	<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	-1,2
CLJU_c09340	<i>pfor</i>	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	-0,3
CLJU_c29340	<i>pfor</i>	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	n.b.
CLJU_c08140	<i>ppdK</i>	Pyruvat-Phosphat-Dikinase	0,9
CLJU_c38600	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvat-Synthase	-0,4
CLJU_c11830	<i>pfl1</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	0,7
CLJU_c25980	<i>pfl2</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	n.b.
CLJU_c39830	<i>pfl3</i>	Pyruvat:Formiat-Lyase	n.b.
<b>PTS-System</b>			
CLJU_c40530		Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase	0,2
CLJU_c21910	<i>HPr</i>	mögliche HPr Kinase/Phosphorylase	-0,8
CLJU_c20590		Fruktose-spezifisches PTS system, IIABC Komponente	-2,1
CLJU_c20600	<i>fruB</i>	1-Phosphofruktokinase	-2,4
CLJU_c20610		Transkriptionsregulator, DeoR Familie	-3,0

**Tab. 38: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse des Xyloseoperons bei Wachstum auf D-Xylose im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit D-Xylose dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus zwei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Xylose-Operon</b>			
CLJU_c18240	<i>xylA</i>	D-Xylose-Isomerase	10
CLJU_c18250	<i>xylB</i>	Xylulose-Kinase	9,7
CLJU_c18270		mögliche Aldose-1-Epimerase	10
CLJU_c18280	<i>xylT</i>	D-Xylosetransporter	8,0
CLJU_c18290	<i>xylR</i>	Transkriptionsregulator, XylR family	3,4

### Expressionsdaten anderer Enzyme

Es konnten insgesamt 93 Gene gefunden werden, die eine unterschiedliche Expression um den Faktor 3 aufweisen. Davon ist bei 37 Genen die Genexpression bei Wachstum auf D-Xylose induziert und bei 56 Genen reduziert. Eine reduzierte Genaktivität weisen u. a. ein Genoperon mit Citrat-Synthase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase (CLJU\_c06610 - 30) mit log<sub>2</sub>-Werten von -4,9 bis -5,5 oder eine Glutamat-Synthase (CLJU\_c17370/80) mit log<sub>2</sub>-Werten von -2,2 bzw. -1,7. Bei Wachstum auf D-Xylose zeigen jedoch Gene (CLJU\_c40610 - 670) eine erhöhte Expression, die Reaktionen des sog. Mesaconat-Wegs zum Abbau von L-Glutamat katalysieren (Buckel, 2001).

### 3.2.8. Transkriptionsanalysen bei Wachstum auf D-Gluconat

Auch für D-Gluconat, eine von D-Glukose abgeleitete Säure wurden Transkriptionsanalysen angefertigt. Dazu wurde *C. ljungdahlii* in PETC-Medium bei 37°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase Zellen zur RNA-Isolation geerntet wie in 2.6.3 beschrieben. Verglichen wurde die Genexpression mit auf Fruktose gewachsenen Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase als Referenzbedingung.

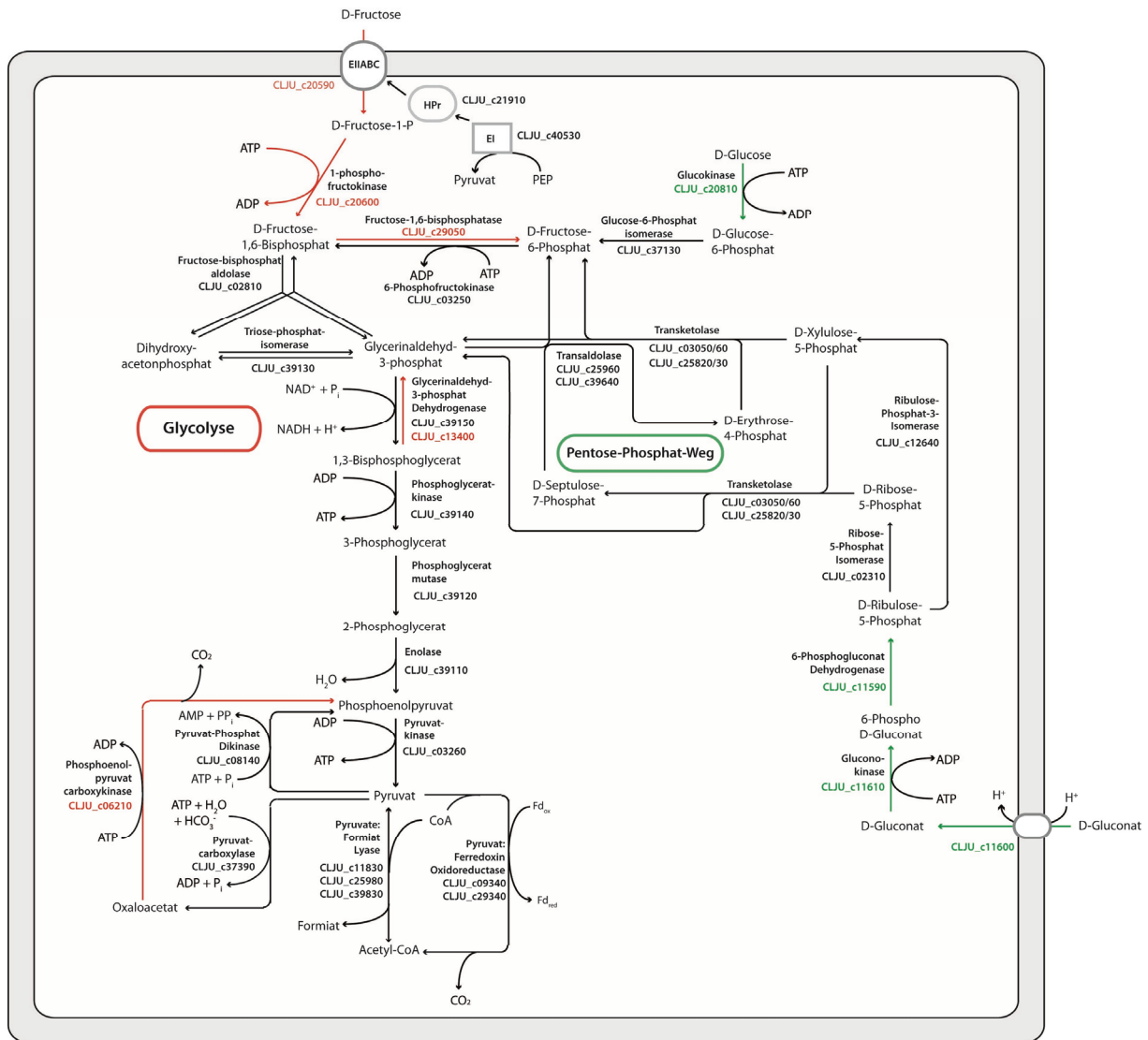
### Expression der Gene des Zentralstoffwechsels bei Wachstum auf D-Gluconat

Die Transkriptionsanalysen zeigen eine Adaption der Genexpression bei *C. ljungdahlii* an die Kohlenstoffquelle D-Gluconat. So wird die Expression des Fruktose-spezifischen Gens IIABC des Phosphotransferase-Systems (PTS) (CLJU\_c20590), der 1-Phosphofruktokinase (CLJU\_c20600) und eines Transkriptionsregulators der DeoR-Familie (CLJU\_c20610) reduziert, wie aus Abb. 36 bzw. Tab. 39 ersichtlich ist.

**Tab. 39: Gen- und ORF-Bezeichnungen, Funktionen und Expressionsverhältnisse des PTS-Systems bei Wachstum auf D-Gluconat im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit D-Gluconat dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis
<b>PTS-System</b>			
CLJU_c40530		Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase	0,1
CLJU_c21910	<i>HPr</i>	predicted HPr Kinase/Phosphorylase	0,7
CLJU_c20590		Fruktose-spezifisches PTS system, IIABC Komponente	-4,8
CLJU_c20600	<i>fruB</i>	1-Phosphofruktokinase	-4,2
CLJU_c20610		Transkriptionsregulator, DeoR Familie	-4,0

Die Expression eines Gluconat-Transporters (CLJU\_c11600) hingegen ist mit einem logarithmischen Wert von 6,2 stark erhöht. Dieser Transporter liegt in einem Gencluster mit einer Gluconokinase und einer 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (siehe Abb. 20).



**Abb. 39: Schematische Darstellung der Gene der Glykolyse, Pentose-Phosphat-Wegs, Pyruvatmetabolismus und Gluconatabbau;** bei Genen, deren Gennummer in rot angegeben ist, liegt eine erhöhte Expression bei Wachstum auf Fruktose vor, bei Gennummern in Grün ist die Expression der Gene bei Wachstum auf D-Gluconat erhöht. Die Expressionsverhältnisse der regulierten Gene sind im Text und **Tab. 40** zu finden.

D-Gluconat wird über die Gluconokinase (CLJU\_c11610) phosphoryliert zu 6-Phospho-D-Gluconat, das wiederum durch eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (CLJU\_c11590) zu Ribulose-5-Phosphat decarboxyliert wird. Beide Enzyme liegen in einem Cluster von Genen, die bei Wachstum auf D-Gluconat log<sub>2</sub>-Werte von 6 bis 8 aufweisen (siehe Tab. 40). Ribulose-5-Phosphat wird in den nicht-oxidativen, reversiblen Teil des Pentosephosphat-Wegs eingeschleust. Es kann über die Ribose-5-Phosphat-Isomerase zu Ribose-5-Phosphat isomerisiert werden, aber auch mithilfe der Ribulosephosphat-3-Epimerase zu Xylulose-5-Phosphat umgelagert werden. Aus drei Molekülen Ribulose-5-Phosphat können mithilfe der Transketolase zwei Moleküle

Fruktose-6-Phosphat und ein Molekül Glyceraldehyd-3-Phosphat entstehen, die wiederum für die Glykolyse bereitstehen. Die Transketolase und die anderen Enzyme des Pentose-Phosphat-Wegs werden unter den hier analysierten Bedingungen scheinbar konstitutiv exprimiert, da die Fluoreszenzsignale in beiden Kanälen ähnlich stark sind und somit keine Regulation dieser Gene ersichtlich ist (siehe Abb. 39). Die Gene der Glykolyse weisen keine Regulation auf, jedoch wird die Expression einer zweiten Kopie der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (CLJU\_c13400) bei Wachstum auf D-Gluconat um einen Wert von -6,1 reduziert. Die Genexpression der Fruktose-1,6-Bisphosphatase, die die Dephosphorylierung von Fruktose-1,6-Bisphosphat in der Gluconeogenese katalysiert, ist ebenfalls mit einem Wert von -4,1 reduziert.

**Tab. 40: Expressionsverhältnisse des Genclusters mit Genen der Gluconatverwertung bei Wachstum auf D-Gluconat im Vergleich zum Wachstum mit Fruktose.** Werte größer 1 stellen eine erhöhte Expression beim Wachstum mit D-Gluconat dar, kleiner -1 hingegen bei Wachstum auf Fruktose. Expressionsverhältnisse mit Werten zwischen -1 und 1 bedeuten, dass keine Regulation zu beobachten war. Die angegebenen Werte sind logarithmisch dargestellt und stellen das arithmetische Mittel aus drei Experimenten dar.

ID	Gen	Funktion/Annotation	log- Expressions- verhältnis
<b>Verwertung von Gluconat</b>			
CLJU_c11560		Zink-haltige Alkoholdehydrogenase	8,0
CLJU_c11570		Xylulosekinase	7,5
CLJU_c11580		D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	7,8
CLJU_c11590		6-Phosphogluconat Dehydrogenase	7,8
CLJU_c11600	<i>gntP</i>	Gluconat/H <sup>+</sup> -Symporter	6,2
CLJU_c11610	<i>gntK</i>	Gluconokinase	6,3
CLJU_c11620		mögliche D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure-Dehydrogenase	6,2
CLJU_c11630		2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase	6,5

### Expressionsdaten anderer Enzyme

Im Vergleich zu den Expressionsdaten, welche sich für den Vergleich von Glukose und Fruktose ergeben haben, ändert sich das Expressionsmuster unter Verwertung von Gluconat nur bei relativ wenigen Genen. Neben den Genen für die Gluconatverwertung, der Glykolyse und des PTS-Systems, konnten 42 Gene detektiert werden, die Unterschiede in der Regulation aufweisen. Darunter sind Gene, die für eine Adenin-Deaminase und einen ABC-Transporter (CLJU\_c26120 – CLJU\_c26150) kodieren und eine reduzierte Genaktivität bei Gluconat

aufweisen oder ein Operon mit erhöhter Expression bei Gluconat, das u.a. eine D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (CLJU\_c00960 – CLJU\_c00980) beinhaltet.

### 3.3. DNA-Transfer in *C. ljungdahlii*

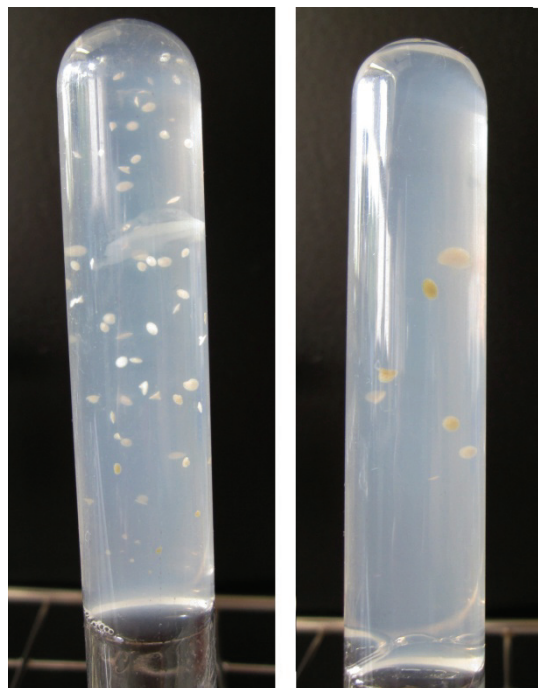
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, Grundlagen für das molekularbiologische und genetische Arbeiten mit *C. ljungdahlii* zu erarbeiten und zu verbessern. Hierbei musste zuerst eine zuverlässige Methode gefunden werden, um transformierte Zellen vereinzeln zu können. Des Weiteren wurde versucht, Methoden zu entwickeln, um Knockout-Mutanten zu generieren, damit die Rolle einzelner Gene im Stoffwechsel genauer erforscht werden kann. Für die Generierung von Knockout-Mutanten gibt es im Moment zwei Methoden: einerseits können Clean Deletion Mutanten durch homologe Rekombination erzeugt werden, so dass selbst in einem Operon keine polaren Effekte entstehen, andererseits können Insertionen in Gene eingebracht werden, z.B. durch das TargeTron bzw. ClosTron-System (Heap *et al.*, 2010; Heap *et al.*, 2007).

#### 3.3.1. Vereinzeln von *C. ljungdahlii*

Es wurden drei verschiedene Methoden getestet, um *C. ljungdahlii* zu vereinzeln. Dazu wurden jeweils zwei verschiedene Medien verwendet – PETC-Medium als Minimalmedium und MRCM-Medium als Vollmedium. Einerseits wurde der Organismus auf Agarplatten ausgestrichen, die im Anaerobenzelt unter Ausschluss von Sauerstoff und Zugabe von Reduktionsmitteln (2.4.1.3) gegossen und getrocknet wurden. Bei weiteren Versuchen wurde *C. ljungdahlii* in Softagar eingegossen, wobei der Agargehalt 0,5% betragen hat. Diese Platten wurden nicht umgedreht inkubiert. Als dritte Methode zur Vereinzeln wurde die Kultivierung in Agarshakes getestet (2.4.1.4). Alle Kulturen wurden bei 37°C inkubiert. Einerseits wurde versucht, den Wildtyp zu vereinzeln, andererseits wurden transformierte Kulturen verwendet, um das Wachstum des Organismus auf Selektivmedium bei allen drei Methoden zu testen.

Die effektivste Methode sowohl auf der Oberfläche von bzw. in festem Medium mit bzw. ohne Antibiotika, einzelne Klone von *C. ljungdahlii* zu erhalten, war die Kultivierung in Agarshakes. Dabei mussten bei Vereinzeln des Wildtyps Verdünnungsreihen in den Agarshakes angefertigt werden, um einzelne Kolonien zu erhalten. Auch bei der Vereinzeln

von transformierten Zellen konnten mit Agarshakes die besten Ergebnisse erzielt werden. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen in Agarshakes angefertigt. Beim Eingießen von *C. ljungdahlii* in Softagar konnte zwar beim WildtypWachstum von Kolonien beobachtet werden, jedoch erhielt man keine Kolonien von transformierten Zellen in Selektivmedium. Das Wachstum von *C. ljungdahlii* auf Agarplatten ohne Softagarschicht war kaum vorhanden, so dass auch bei Ausplattieren von 200µL exponentiell wachsender Flüssigkultur ( $OD_{600} = 0,7$ ) nur vereinzelte Kolonien gewachsen waren, auf Selektivmedium konnte kein Wachstum beobachtet werden. Deshalb wurde die Vereinzelung von *C. ljungdahlii* mit Agarshakes in den nachfolgenden Experimenten verwendet. Die Kolonien in den Agarshakes waren weißlich bis beige und hatten ein diskus-ähnliches Aussehen (siehe Abb. 40).



**Abb. 40: Kolonien von *C. ljungdahlii* in Agarshakes in verschiedenen Verdünnungsstufen**

Des Weiteren wurde getestet, wie gut gepickte Einzelkolonien von Festmedium wieder in Flüssigmedium anwachsen. Dafür wurden Kolonien aus dem Agar gepickt und damit 5mL Flüssigmedium angeimpft. Bei Tests mit dem Wildtyp ohne Selektion konnte auch außerhalb des Anaerobenzelts gearbeitet werden, da die Hungate-Röhrchen abschließend nochmals mit Stickstoff begast wurden um eine sauerstofffreie Gasphase für das Wachstum zu

gewährleisten. Kolonien von transformierten Zellen, die in Medium mit Antibiotika kultiviert wurden, mussten im Anaerobenzelt gepickt werden, da sie sensitiver auf Sauerstoffstress reagierten und beim Picken außerhalb des Anaerobenzelts kein Wachstum zu beobachten war. Von den in Flüssigmedium angeimpften Kolonien wuchsen beim Wildtyp ohne Antibiotika 90 – 100% der Kulturen wieder an, bei den Klonen in Selektivmedium betrug die Rate der angewachsenen Kolonien 20 – 50%.

### 3.3.2. Minimale Hemmkonzentration verschiedener Antibiotika bei

#### *C. ljungdahlii*

Für die Transformation von *C. ljungdahlii* wurden Plasmide mit verschiedenen Antibiotika-Resistenzkassetten verwendet, um positive Klone durch Selektion mit entsprechenden Antibiotika identifizieren zu können. Hierfür mussten zuerst die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der einzelnen Antibiotika in Flüssig- und Festmedium ausgetestet werden (siehe Tab. 41). Als Kontrolle wurde immer eine Kultur in Medium mit dem jeweiligem Lösungsmittel angeimpft.

**Tab. 41: MHK in Flüssig- und Festmedium und Arbeitskonzentrationen der verwendeten Antibiotika bei *C. ljungdahlii*;** ‘-’: nur Wachstum in Kontrolle ohne Antibiotikum

Antibiotika	MHK in Flüssigmedium	MHK in Agarshakes	Arbeitskonzentration
Erythromycin	-	0,5µg/mL	1µg/mL
Clarithromycin	0,1µg/mL	0,5µg/mL	1µg/mL
Thiamphenicol	5µg/mL	5µg/mL	7,5µg/mL
Kanamycin	-	0,1µg/mL	1µg/mL
Polymyxin B	*	10µg/mL	-

\*Polymyxin B sollte zur Selektion gegen *E. coli* in der Konjugation bei einer Konzentration von 40µg/mL verwendet werden. Da bei der Konjugation die Zellsuspensionen sofort in Agarshakes eingegossen wurden, war es nicht nötig Polymyxin B in Flüssigmedium zu testen. MHK: Minimale Hemmkonzentration

Dabei konnte gezeigt werden, dass *C. ljungdahlii* sehr sensitiv gegenüber Erythromycin, Clarithromycin und Kanamycin ist, aber auch Thiamphenicol als Selektionsmarker geeignet ist. Zur Transformation von *C. ljungdahlii* wurden verschiedene Plasmide mit Resistenzkassetten für diese Antibiotika getestet. Obwohl Gram-positive Bakterien eine natürliche Resistenz gegenüber Polymyxin B aufweisen, hat sich gezeigt, dass *C. ljungdahlii* sensitiv auf dieses Antibiotikum reagiert.



### 3.3.3. Veränderung des bestehenden Transformationsprotokolls

Mit dem bisher bestehenden Transformationsprotokoll für *C. ljungdahlii* konnten verschiedene Plasmide (pIMP1, pSOS*sacB*, pCH1, pMAD) in den Organismus eingebracht werden, jedoch war die Effizienz gering. Probleme gab es vor allem bei der Regeneration der Zellen. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort in 5mL PETC-Medium mit Fruktose überführt und anschließend bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Zunahme der Trübung im Medium zu beobachten war. Anschließend wurden Aliquots von 200 – 500µL Kultur in Flüssigmedium mit Antibiotika überimpft. Mit den bisher verwendeten Parametern wuchsen jedoch in 60 - 70% der Transformationen die Zellen schon in der Regenerationsphase nicht mehr bzw. erst nach 2-3 Tagen an. Auch ein Wechsel von PETC- zu reichem MRCM-Medium für die Regeneration brachte keine Veränderung. Deshalb wurden verschiedene Kombinationen der Elektroporationsparameter getestet (siehe Tab. 42). Dafür wurde jeweils das Plasmid pCH1 verwendet, um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.

**Tab. 42: getestete Parameter der Transformation von *C. ljungdahlii***

Parameter	Variation
Spannung	1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5 kV
Widerstand	200, 400, 600, 800 Ω
Kapazität	25 oder 50 µF

Die besten Ergebnisse konnten mit den Parametern 1,75 kV, 25 µF und 800 Ω erzielt werden. Ab einer Spannung von 2,25 kV und bei einer Kapazität von 50µF nahm die Effizienz der Zellregeneration nach der Elektrotransformation ab. Eine Transformationseffizienz konnte nicht bestimmt werden, da die Zellen erst in Flüssigmedium mit Antibiotika zur Selektion der positiven Klone angezogen wurden und dann erst zur Vereinzelnung in Agarshakes eingegegossen wurden.

### 3.3.4. Konjugation von *C. ljungdahlii*

Als weitere Methode zum Einbringen von Plasmiden in *C. ljungdahlii* wurde die Konjugation getestet. Dafür werden Donorstämme benötigt, die die Gene für die Ausbildung der Konjugation besitzen. Diese Gene können Chromosomen- oder Plasmid-kodiert vorliegen (Des Purdy *et al.*, 2002; Itaya *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 1983).

Da der Organismus nicht auf Agarplatten wuchs, wurde die Konjugation in Flüssigmedium durchgeführt (2.10.2.2). Dabei wurde die Übertragbarkeit von Plasmiden einerseits von einem Gram-negativen zu einem Gram-positiven Bakterium, andererseits zwischen zwei Gram-positiven Arten getestet. Es wurde versucht, pKV12, pIMPoriT bzw. pKVM1 von *E. coli* nach *C. ljungdahlii* zu übertragen. Diese Plasmide haben den gleichen *oriT* (*origin of transfer*), ursprünglich von Plasmid RP4 (Pansegrau *et al.*, 1994), assoziiert mit *traJ*, dessen Genprodukt eine essentielle Rolle in der Initiation des DNA-Transfers spielt. Jedoch besitzen diese Plasmide verschiedene Gram-positive *oriR* (*origin of replication*) und unterschiedliche Antibiotika-Resistenzkassetten (siehe Tab. 43), um auszuschließen, dass diese Faktoren einen Einfluss auf die Konjugation ausüben. Da für die Konjugation der *E.coli*-Stamm S17-1 verwendet wurde, der eine ins Chromosom integrierte Version des Plasmids RP4-2(Tc::Mu) besitzt. Dadurch ist nur der Bereich des *oriT* und *traJ* für eine Konjugation auf dem Plasmid notwendig. Zur Selektion von positiven Transkonjuganten von *C. ljungdahlii* wurden die entsprechenden Antibiotika und zusätzlich Polymyxin B zur Selektion gegen *E. coli* verwendet.

Als zweite Möglichkeit sollten die Plasmide pUB110 und pBC16 von *B. subtilis* auf *C. ljungdahlii* übertragen werden. Diese beiden Plasmide besitzen den gleichen *oriR* und *oriT* und unterscheiden sich lediglich in der Antibiotika-Resistenzkassette (siehe Tab. 43). Da *B. subtilis* anaerob nicht in den verwendeten Agarshakes wächst, musste nicht zusätzlich gegen diesen Organismus selektiert werden.

**Tab. 43: Auflistung der bei der Konjugation verwendeten Plasmide unter Angabe der Resistenzkassette, des *oriT*, der Gram-positiven und Gram-negativen *oriR* und der beteiligten Donor- und Rezipientenorganismen;** Plasmidkarten der angegebenen Plasmide befinden sich im Anhang

Plasmid	Resistenz	<i>oriT</i>	(-)- <i>oriR</i>	(+)- <i>oriR</i>	Donor	Rezipient	Wachstum
pKV12	<i>tetM</i>	<i>oriT</i> + <i>traJ</i>	pBR322	pAMβ1	<i>E. coli</i>	<i>C. ljungdahlii</i>	-
pIMPoriT	<i>ermB</i>	<i>oriT</i> + <i>traJ</i>	pBR322	<i>repL</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. ljungdahlii</i>	-
pKVM1	<i>ermC</i>	<i>oriT</i> + <i>traJ</i>	pBR322	pE194ts	<i>E. coli</i>	<i>C. ljungdahlii</i>	-
pUB110	<i>kanR</i>	<i>mob</i>	-	<i>repU</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. ljungdahlii</i>	+
pBC16	<i>tet</i>	<i>mob</i>	-	<i>repU</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. ljungdahlii</i>	-

Transkonjuganten lieferte lediglich der Vektor pUB110. Dies konnte jedoch nur einmal reproduziert werden. Obwohl pKV12 schon erfolgreich in andere Gram-positive Bakterien

wie *A. woodii* DSM 1030 oder *Enterococcus faecalis* JH2-2 übertragen wurde (Stratz *et al.*, 1994), konnten hier keine Transkonjuganten erzielt werden.

Alle in der Konjugation verwendeten Plasmide wurden zusätzlich durch Elektroporation in *C. ljungdahlii* eingebracht, um zu überprüfen, um Effekte der unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzkassetten bzw. der *oriR* auszuschließen. Es konnten lediglich mit den Plasmiden pUB110 und pIMPoriT Transformanten erzielt werden. Bei beiden Methoden waren die Plasmide jedoch nicht stabil und konnten nach 5-8 Passagen nicht mehr in *C. ljungdahlii* nachgewiesen werden bzw. das Wachstum des Organismus wurde schwächer, bis kein Wachstum mehr zu beobachten war. Dass pIMPoriT durch Elektrotransformation, nicht jedoch durch Konjugation in *C. ljungdahlii* übertragen werden konnte, lässt den Schluss zu, dass der *oriT* aus pKV12 nicht in diesem Organismus funktioniert.

### 3.3.5. Verwendung verschiedener Gram-positiver *origins of replication*

Da die bisher vorhandenen Plasmide, die auf pIM13 basieren, nicht stabil in *C. ljungdahlii* etabliert werden konnten, wurde getestet, ob Plasmide mit anderen Replikationsursprüngen bzw. Replikationsproteinen eine höhere Stabilität aufwiesen. Dazu wurden Plasmide verwendet, die bisher in *C. acetobutylicum*, *S. aureus* bzw. in der Gattung *Bacillus* genutzt wurden. Außerdem wurde darauf geachtet, dass sich die Plasmide in der Art der Replikation unterscheiden. Die Plasmide pKV12, pCH9, pMTL500e besitzen einen pAM $\beta$ 1-, und pJIR750 einen pIP404-Replikationsursprung, die nach dem Theta-Mechanismus replizieren. Dabei wird eine *primer RNA* (pRNA) synthetisiert, die sich an die aufgeschmolzene Matrize am Replikationsursprung (*ori*) anlagert und von der aus DNA durch Verlängerung der pRNA synthetisiert wird. Die DNA-Synthese ist bei diesem Mechanismus kontinuierlich am *leading strand* und diskontinuierlich am *lagging strand* (del Solar *et al.*, 1998).

Die restlichen Plasmide (siehe Tab. 44) werden mittels des *rolling circle*-Mechanismus repliziert. *Rolling circle*-replizierende Plasmide werden in vier Unterfamilien eingeteilt, basierend u. a. auf der genetischen Organisation und Homologie der Rep-Proteine (Espinosa *et al.*, 1995; Novick, 1989). Von jeder dieser vier Familien wurde ein oder mehrere Plasmide ausgewählt und getestet. Diese Plasmide wurden einerseits als Originalplasmide in *C. ljungdahlii*, andererseits wurden die Regionen der Replikationsursprünge in den Vektor pCH1 kloniert, um Effekte der unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzkassetten ausschließen

zu können. Alle Plasmide wurden mittels Elektrottransformation in *C. ljungdahlii* übertragen. Eine Auflistung der Plasmide und ihrer Replikationsmechanismen erfolgte in Tab. 44.

**Tab. 44: Tabelle mit in *C. ljungdahlii* getesteten Plasmide mit Angabe von Replikationsursprung und Replikationsmechanismus**

Replikationsursprung	Plasmide	Replikationsmechanismus
pAMa/pC194 Familie	pUB110, pBC16, pCH3, pCH5,	Rolling Circle-Mechanismus, pUB110-Familie
<i>repL</i> von pIM13	pIM13, pIMP1, pSOS, pCH1, pCH6	Rolling Circle-Mechanismus, pIM13-Familie
pAMβ1	pKV12, pCH9, pMTL500e	Theta-Mechanismus
pE194ts	pMAD, pKVM1	Rolling Circle-Mechanismus, pMV158-Familie
<i>repC</i>	pT181cop-608, pCH7	Rolling Circle-Mechanismus, pT181-Familie
pIP404: <i>rep</i> + <i>ori</i>	pJIR750	möglicherweise Theta- Mechanismus

Nachdem alle Plasmide in *C. ljungdahlii* durch Elektroporation transformiert wurden, konnten bei Vektoren mit einem Theta-Replikationsmechanismus (pKV12, pMTL500e, pJIR750) kein Wachstum nach Zugabe des passenden Antibiotikums zur Selektion beobachtet werden. Selektiert wurde bei mit pKV12 transformierten Zellen mit 15µg/mL Tetracyclin, bei pMTL500e mit 1µg/mL Clarithromycin und bei pJIR750 mit 7,5µg/mL Thiamphenicol als Endkonzentration im Medium. Auch bei pMAD und dem sehr ähnlichen pKVM1, beide mit dem temperatursensitiven, Gram-positiven *oriR* pE194ts, konnten trotz Inkubationstemperatur von 30°C keine Transformanten erzielt werden. pCH7 konnte zwar eine Resistenz gegenüber Clarithromycin als Antibiotika generieren (1µg/mL), jedoch war das Wachstum schwach und in der 2. – 3. Passage konnte kein Wachstum der Kulturen mehr beobachtet werden. Außerdem ließ sich das Plasmid weder durch eine Re-Transformation in *E. coli* noch durch PCR mit plasmid-spezifischen Primern nachweisen. Erfolgreicher konnten Plasmide der *rolling circle*-Familien mit Replikationsursprung von pUB110 und pIM13 transformiert werden. Bei pUB110, pCH3 und Derivaten konnten Klone vereinzelt werden und die Kulturen zumindest 4 - 6 mal überimpft werden, bevor das Plasmid nicht mehr nachweisbar war. Eine Ausnahme machte pBC16, auf dessen Präsenz nicht selektiert werden konnte, was aber vermutlich auf die fehlende Funktionalität des Tetracyclin-Resistenzgens in *C. ljungdahlii* zurückzuführen ist.

Plasmide mit einem Replikationsursprung der pIM13-Familie besaßen die größte Stabilität in diesem Organismus, wobei auch hier die Plasmide wieder verloren gingen. Transformierte Kulturen mit einem dieser Plasmide konnten 8 - 10 mal passagiert werden, bis kein Wachstum mehr zu beobachten war.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Versuche mit Plasmiden durchgeführt, die einen Replikationsursprung von pUB110 oder pIM13 beinhalten.

### 3.3.6. Suche nach einem negativen Selektionsmarker

Für eine Etablierung eines Clean-Deletion-Systems für *C. ljungdahlii* ist es sinnvoll, einen negativen Selektionsmarker für das Selektieren einer zweiten homologen Rekombination zu verwenden. Da es bisher keine Tests diesbezüglich gab, wurde einerseits die Sensitivität des Organismus auf verschiedene Basenanaloga für die Etablierung eines Systems auf Basis des *upp*-Gens zu etablieren. Andererseits wurde das Wachstum von *C. ljungdahlii* auf Saccharose getestet.

#### 3.3.6.1. Sensitivität von *C. ljungdahlii* auf die Basenanaloga 5-Fluorouracil und Thioguanin

In verschiedenen Bakterien wurde ein *clean deletion*-System auf Basis von Genen etabliert, die in die Purin- bzw. Pyrimidin-Biosynthese involviert sind. Dabei werden bestimmte Gene dieser Biosynthesewege, z. B. *upp* (Uracil-Phosphoribosyl-Transferase), *pyrE* (Orotat-Phosphoribosyl-Transferase) oder *hprT* (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) deletiert, um die Nukleotid-Biosynthese zu inaktivieren. Dadurch wird der Organismus resistent gegenüber dem Einbau des entsprechenden Basenanalogen. Mit Hilfe der deletierten Gene, die auf dem Plasmid zur Gegenselektion verwendet werden, wurden in unterschiedlichen Organismen Deletionssysteme aufgestellt (Boeke *et al.*, 1984; Goh *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 2009; Kristich *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2010).

Um dieses Deletionssystem verwenden zu können, muss *C. ljungdahlii* sensitiv gegenüber dem toxischen Basenanalogon sein. Dies wurde mit drei verschiedenen Substanzen – 5-Fluorouracil, 5-Fluoroorotat und 6-Thioguanin – in Flüssigmedium bis Konzentrationen von

1mg/mL getestet. Der Organismus zeigte keine Sensitivität gegenüber den Substanzen und kann diese toxischen Basenanaloga abbauen.

### 3.3.6.2. Verwertung von Saccharose

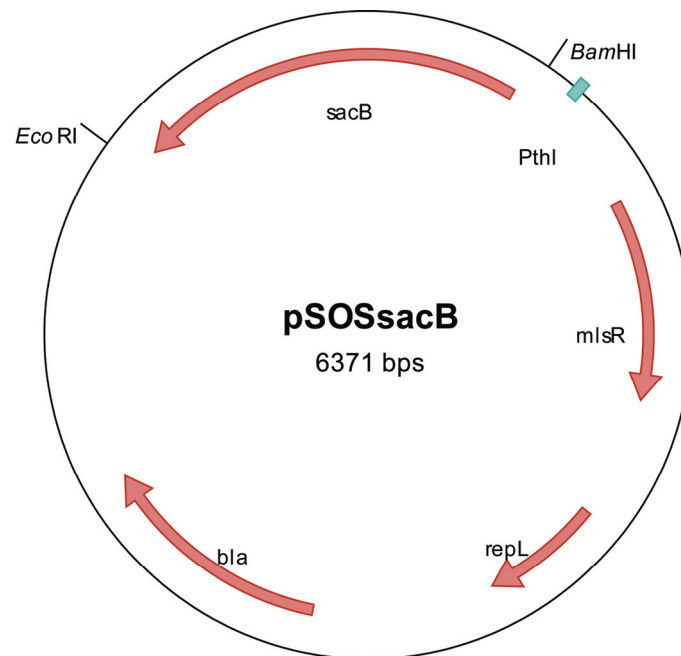
Eine weitere Variante für ein Markergen zur Gegenselektion ist *sacB* (kodiert für eine Levansucrase). Dieses Enzym katalysiert die Bildung des Polysaccharids Levan aus Saccharose, das bei einigen Bakterien Hauptbestandteil der Schleimhülle um die Zelle ist. Verbleibt Levan in der Zelle oder bei Gram-negativen Bakterien im periplasmatischen Raum zwischen der Zellwand und der äußeren Membran, sterben die Zellen ab. Dies macht man sich zunutze, indem man *sacB* zur Gegenselektion bei Deletionssystemen einsetzt. Bei Gram-positiven Bakterien wurde diese Methode bisher nur bei hoch-GC-Organismen wie *Corynebacterium* oder *Mycobacterium* getestet (Jäger *et al.*, 1992; Pelicic *et al.*, 1996). Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung des *sacB*-Gens ist, dass der Organismus kein eigenes *sacB*-Gen besitzt und Saccharose nicht verwerten, jedoch in Gegenwart von 10% Saccharose wachsen kann. Deshalb wurde einerseits getestet, ob *C. ljungdahlii* Saccharose verwerten kann, andererseits wurde überprüft, ob der Organismus in Anwesenheit von 10% Saccharose im Medium mit Fruktose als Substrat wachsen kann.

Im Genom konnte kein ORF identifiziert werden, der Ähnlichkeiten zu *sacB*-Genen aus anderen Firmicutes aufweist. Um das Wachstum von *C. ljungdahlii* auf Saccharose zu testen, wurde es als einzige C-Quelle getestet. Da in der ersten Passage nur leichtes Wachstum durch den Rest Fruktose aus der Vorkultur, in der zweiten Passage kein Wachstum mehr zu beobachten war, kann Saccharose nicht verwertet werden. In PETC-Medium mit 10% Saccharose wuchs *C. ljungdahlii* mit einer verlängerten lag-Phase zu ähnlicher Zelldichte wie in PETC-Medium ohne diesen Zusatz. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Verwendung von *sacB* als negativer Selektionsmarker für *C. ljungdahlii* geeignet sein könnte.

### 3.3.6.3. Verwendung von *sacB* als negativen Selektionsmarker

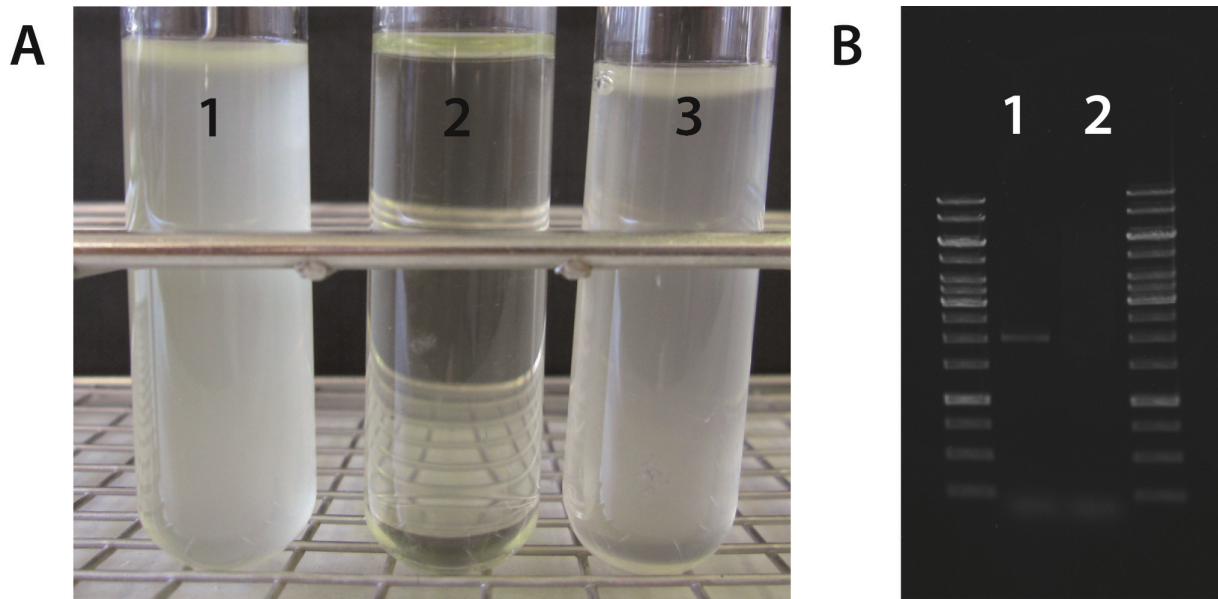
Um die Funktionalität von *sacB* in *C. ljungdahlii* zu überprüfen, wurde das *sacB*-Gen des Vektors pK19mobSacB via PCR amplifiziert und über die angefügten Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in den *Clostridium-E.coli*-Shuttlevektor pSOS95 eingefügt (siehe Abb. 41). Dabei wurde das Gen in Leserichtung hinter den schon existierenden Thiolase-Promotor (*PthI*) von

*C. acetobutylicum* kloniert, um eine Transkription des Gens zu gewährleisten. Von diesem Promotor wurde schon gezeigt, dass er in *C. ljungdahlii* funktioniert (Köpke, 2009a).



**Abb. 41: Plasmidkarte von pSOSsacB**

Dieses Plasmid wurde erfolgreich mittels Elektroporation in *C. ljungdahlii* transformiert. Ein Klon wurde ausgewählt, mit dem Wachstumstests durchgeführt wurden. Aus einer Vorkultur wurden verschiedene Medien angeimpft, um die Funktionalität des *sacB*-Gens zu testen. Dabei wurde eine Kultur in Medium mit 1 µg/mL Clarithromycin zur Selektion des Plasmids angezogen, eine Kultur in Medium mit 10% Saccharose und Medium mit beiden Substanzen. Sowohl in der Kultur mit Clarithromycin als auch in der Kultur mit Saccharose konnte Wachstum beobachtet werden. Die Kombination der beiden Substanzen war letal für den Organismus. Aus den gewachsenen Kulturen wurde genomische DNA isoliert und darauf eine PCR auf das Vorhandensein des *sacB*-Gens gemacht. Dabei konnte gezeigt werden, dass in der Kultur mit Clarithromycin eine Bande zu sehen ist, in der Kultur mit 10% Saccharose konnte kein Produkt detektiert werden (siehe Abb. 42). Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass *sacB* in *C. ljungdahlii* funktioniert, und es in Anwesenheit von Saccharose lethal wirkt. Wenn nicht zusätzlich mit Antibiotikum auf das Plasmid selektiert wird, verlieren die Zellen das Plasmid und können weiterwachsen, bei zusätzlichem Selektionsdruck mit Antibiotikum zum Verbleib des Plasmids sterben die Zellen ab.



**Abb. 42: Test auf Funktionalität von pSOSsacB in *C. ljungdahlii***; A: Wachstum von *C. ljungdahlii* pSOSsacB in PETC-Medium mit (1) 1µg/mL Clarithromycin, (2) 1µg/mL Clarithromycin + 10% Saccharose, (3) 10% Saccharose; B: Nachweis von *sacB* in *C. ljungdahlii* durch PCR aus Kulturen gewachsen mit (1) 1µg/mL Clarithromycin bzw. (2) 10% Saccharose

Es wurde ein weiterer Vektor (pCH2, siehe Abb. 62) konstruiert, indem *sacB* über die Schnittstellen *NarI* und *NdeI* in pCH1 kloniert wurde. Jedoch war hier kein zusätzlicher Clostridien-spezifischer Promotor vor *sacB* vorhanden, wie dies in pSOSsacB der Fall ist. Dieser Promotor scheint einen Effekt auf die Expression von *sacB* zu haben, da die Zellen mit pCH2 bei gleichzeitiger Anwesenheit von Saccharose und Clarithromycin nicht absterben (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.3.7. Anpassung des ClosTron-Systems in *C. ljungdahlii*

Das *ClosTron Gene Knockout* System ist eine Methode um Gene in Clostridien gezielt und dauerhaft auszuschalten und basiert auf dem *Lactococcus lactis* Gruppe II Intron (Heap *et al.*, 2007). Im Gegensatz zur konventionellen DNA-Transposon-Mutagenese funktioniert das System sequenzspezifisch und nicht zufällig (Frazier *et al.*, 2003). Die Selektion auf Integrationsmutanten im Organismus beruht auf dem sog. RAM-System (*retrotransposition-activated selectable marker*) (Zhong *et al.*, 2003). Dabei ist eine modifizierte *ermB*-Resistenzkassette, das für eine Erythromycin-Resistenz kodiert, in ein Gruppe II Intron in entgegengesetzter Leserichtung integriert, das auf dem Plasmid von dem Gruppe I Intron td unterbrochen und somit inaktiviert ist. Da das selbst-spleißende Gruppe I Intron in

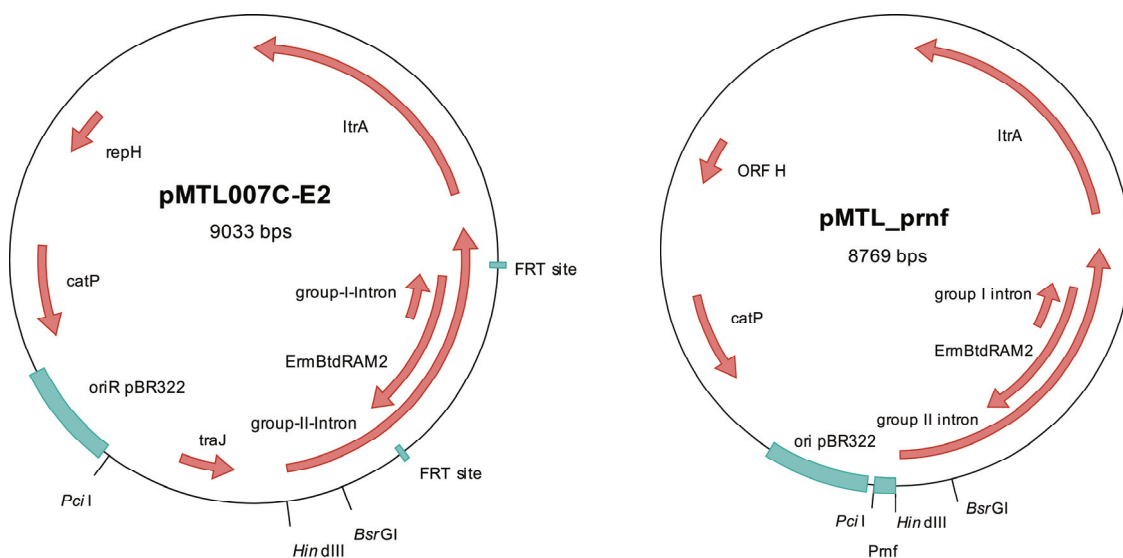


gegenläufiger Leserichtung der Antibiotikum-Kassette in das *ermB*-Gen inseriert ist, kann bei Transkription vom Promotor des *ermB*-Gens kein funktionelles Gruppe I Intron entstehen. Erst bei Transkription vom Promotor des Gruppe II Introns aus, wird das Gruppe I Intron in richtiger Orientierung abgelesen. Dieses spleißt sich selbst aus dem Transkript und aktiviert so die Antibiotikumresistenz (Heap *et al.*, 2007). Das Gruppe II Intron besitzt spezifische, zueinander komplementäre Sequenzelemente (IBS1/2,  $\delta$  und EBS1/2,  $\delta'$ ), die für das spezielle Spleißen der Intron-RNA durch das LtrA-Protein notwendig sind. Zusätzlich zu dem Intron ist das Gen für das LtrA-Protein auf dem Plasmid kodiert, das die RNA des Gruppe II Introns spleißt und mit ihr einen Riboproteinkomplex bildet. Dieser Komplex erkennt durch komplementäre Sequenzelemente in der Intron-RNA (*exon-binding sites* EBS1 und EBS2) die DNA-Zielsequenz (*intron-binding sites* IBS1 und IBS2) und integriert die RNA in einen Strang der DNA. Durch die Reverse Transkriptase-Aktivität des LtrA wird die RNA in DNA umgeschrieben und von wirtseigenen Reparatursystemen zu einem Doppelstrang vervollständigt. Die Integration ist somit nur erfolgreich, wenn die Intron-RNA komplementäre Sequenzelemente zum angestrebten Integrationsort trägt. Mit Hilfe eines Computeralgorithmus nach Perutka (Perutka *et al.*, 2004) konnten Erkennungssequenzen der Intron-RNA im Zielgen gesucht werden. Durch PCRs mit Mutageneseprimern wurde die Sequenz des Gruppe II Introns so verändert, dass das Intron in die gewünschte Zielsequenz inseriert. Diesen Prozess bezeichnet man als *retrohoming* (Zhong *et al.*, 2003).

#### 3.3.7.1. pMTL007-Plasmide

Die Mutageneseprimer wurden durch ein Programm zur automatischen Primergenerierung (<http://clostron.com/clostron2.php>) nach dem Algorithmus von Perutka generiert (Heap *et al.*, 2010). Zielgene waren einerseits *rnfC*, andererseits CLJU\_c27830 (Betainreduktase Komponente B Untereinheit  $\gamma$ ). Mit Hilfe dieser Primer wurden die Erkennungssequenzen des Introns durch SOEing-PCRs verändert und eine 338bp lange DNA-Sequenz generiert, die mittels der Schnittstellen *Hind*III und *Bsr*GI in den Vektor eingefügt wurden. Innerhalb dieser Sequenz liegen die Erkennungssequenzen, die während der PCR verändert wurden, damit sie komplementär zur gewünschten Zielsequenz sind. Es wurde der Vektor pMTL007C-E2 verwendet, da dieser kleiner als der Ursprungsvektor pMTL007 ist und vor dem Gruppe II Intron statt des induzierbaren *fac*-Promotors der konstitutive *fdx*-Promotor aus *C. sporogenes* liegt. Da nach mehreren Transformationen von *C. ljungdahlii* keine Clarithromycin-resistenten Klone isoliert werden konnten, wurde der *fdx*-Promotor vor dem Gruppe II Intron gegen einen *C. ljungdahlii*-spezifischen Promotor ausgetauscht. Dafür wurde der Promotor

vor CLJU\_c11350, einem *upstream* von *rmfC* liegendem Regulatorgen, bestimmt (siehe 3.1.4.1) und über die Schnittstellen *PciI* und *HindIII* in den Vektor pMTL007C-E2 kloniert (siehe Abb. 43). Dabei wurde zusätzlich *traJ*, das bei der Konjugation wichtig ist, entfernt. Außerdem besitzen beide Plasmide einen Gram-negativen Origin (*oriR* pBR322), ein Chloramphenicol/Thiamphenicol-Resistenzgen (*catP*), *repH* als Gram-positives Replikationsprotein und *ltrA* und das Gruppe II Intron mit der ErmBtdRAM2-Kassette.



**Abb. 43:** Vektoren pMTL007C-E2 und pMTL\_prnf; Gene sind als rote Pfeile in ihrer Orientierung eingezeichnet, oriR und Promotorbereiche als blaue Kästen eingezeichnet.

Auch mit dem Vektor pMTL\_prnf\_reg konnte nach mehreren Versuchen keine Integration in das Genom nachgewiesen werden, so dass beide Vektoren für *C. ljungdahlii* nicht geeignet waren. Deshalb wurden die Plasmide pCH5 und pCH6 konstruiert.

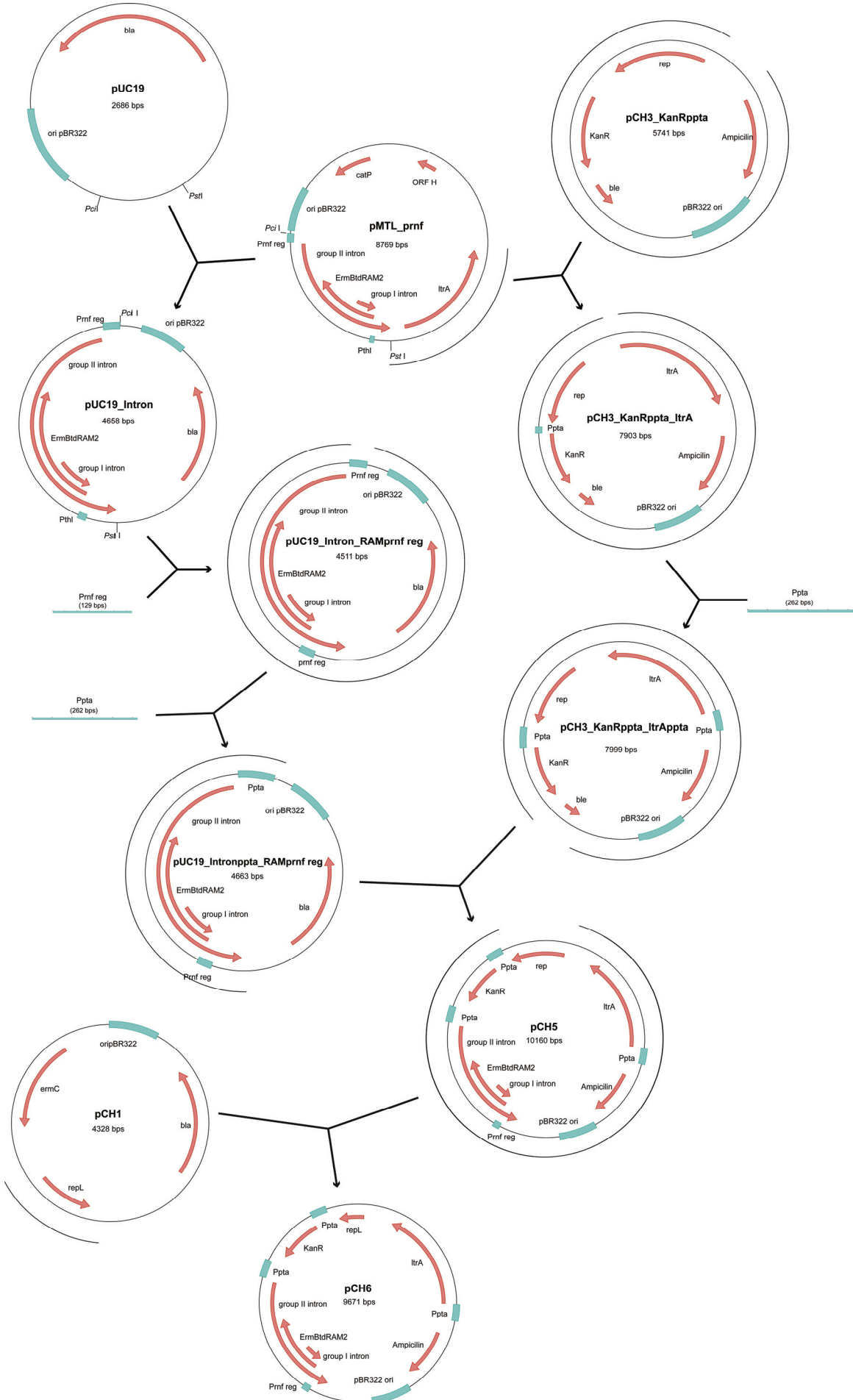
### 3.3.7.2. Konstruktion von pCH5 und pCH6

Das Intron *ltrB* und *ltrA* des Plasmids pMTL007 wurden in den Vektor pCH3 kloniert und zusätzlich die Promotoren von *ermB* und *ltrA* gegen Promotoren von *C. ljungdahlii* ausgetauscht. Der Vektor pCH3 wurde als Grundgerüst des neuen Plasmids verwendet, da er, neben einem semi-stabilen Gram-positiven *oriR*, mit *kanR* eine Antibiotikumresistenz auf dem Plasmid trägt, die in *C. ljungdahlii* funktioniert. Er trägt außerdem als Selektionsmarker

für *E. coli* eine Ampicillinresistenzkassette (*ampR*) und den Gram-positiven Replikationsursprung von pUB110. Da Promotoren möglichst punktgenau vor die entsprechenden Gene kloniert werden müssen, um ihre Aktivität nicht zu zerstören und da es sich für pMTL007 als sehr schwierig erwies, geeignete Schnittstellen zu finden, wurden die Plasmide größtenteils mittels Hybridisierung erstellt (siehe Fließschema Abb. 44).

Für pMTL007 wurde *ltrA* aus dem Intron teilweise herausgeschnitten, damit es stabil integriert bleibt, wenn die Zelle das Plasmid verloren hat. Dies hat jedoch zur Folge, dass die Promotorsequenz von *ltrA* ein zweites Mal innerhalb der Sequenz des Gruppe II Intron vorkommt und bei der Klonierung stört. Deshalb wurde das Intron zunächst in pUC19 mit PstI und PstI subkloniert und darin durch Hybridisierung der Promotor von *ermB* gegen den *C. ljungdahlii*-eigenen Promotor von CLJU\_c11350 ausgetauscht. Außerdem wurde in diesem Vektor die Erkennungssequenzen des Gruppe II Intron umprogrammiert (analog zu pMTL), da eine weitere *Bsr*GI-Schnittstelle im *kanR*-Gen von pCH3 vorliegt. Es wurden dieselben Zielgene gewählt wie bei 3.3.7.1 (*rnfC* und CLJU\_c27830). Gleichzeitig wurde *ltrA* via Hybridisierung in pCH3 kloniert. Hier wurde auch der Promotor von *ltrA* gegen eine 275 bp lange Sequenz mit dem vermuteten Promotor direkt *upstream* des Phosphotransacetylase-Gens von *C. ljungdahlii* ausgetauscht. Anschließend wurde das Gruppe II Intron in diesen Vektor durch Hybridisierung eingefügt woraus pCH5 resultierte. Zusätzlich wurde pCH6 konstruiert, das sich durch einen Austausch des Gram-positiven Replikationsproteins von pUB110 gegen das von pIM13 auszeichnet. Auch dieser Austausch wurde mittels Hybridisierung erzeugt.

**Abb. 44 (nächste Seite):** Fließschema zur Konstruktion der Vektoren pCH5 und pCH6: rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid, blaue Kästen stehen für Regionen der Replikation (*oriR*) und Promotorbereiche (*Ppta*, *Prnf* reg bzw. *Pthl*). Schwarze Linien über den Plasmidkarten geben den Bereich der PCR-Amplifikation wieder; Verwendete Restriktionsschnittstellen sind unter Angabe ihrer Position im Plasmid eingezeichnet



### 3.3.7.3. Insertion von Intron II in das Genom von *C. ljungdahlii*

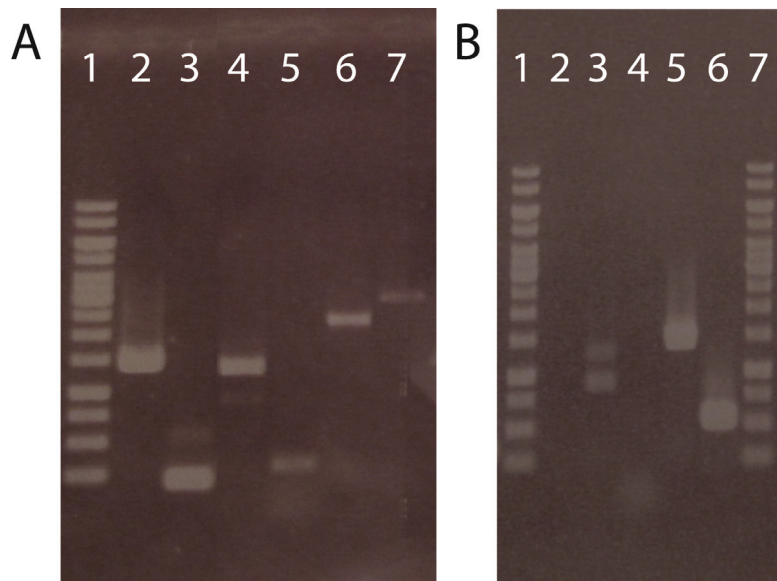
Auch pCH5 und pCH6 wurden via Elektrotransformation in *C. ljungdahlii* transformiert. Um Klone mit Insertionen zu isolieren, wurden verschiedene Selektionsstrategien mit den verschiedenen Antibiotika getestet (siehe Tab. 45). Mit Kanamycin wurde auf die Präsenz des Vektors selektiert, mit Clarithromycin auf die Insertion des Gruppe II Introns. Nach Wachstum in der 1. Passage mit Antibiotika wurde ein Teil der Kultur zum weiteren Passagieren der Kultur in Flüssigmedium mit Antibiotikum, ein anderer Teil wurde zum Vereinzeln in Agarshakes genutzt.

**Tab. 45: Übersicht über die verschiedenen Selektionsstrategien für Insertionsereignisse bei *C. ljungdahlii***

Erstselektion	2. Passage	3. Passage	Erfolg	
			Wachstum in Flüssigmedium	Kolonien in Agarshakes
Flüssigmedium	Flüssigmedium	Agarshakes		
Kanamycin	Kanamycin	Kanamycin	(+)*	-
Kanamycin	Kanamycin	Clarithromycin	(+)*	-
Kanamycin	Clarithromycin	Kanamycin	+	-
Kanamycin	Clarithromycin	Clarithromycin	+	+
Clarithromycin	Kanamycin	Kanamycin	-	-
Clarithromycin	Kanamycin	Clarithromycin	-	-
Clarithromycin	Clarithromycin	Kanamycin	-	-
Clarithromycin	Clarithromycin	Clarithromycin	-	-

\* Wachstum war in der 2. Passage in Flüssigmedium schon deutlich schwächer und konnte nur selten nochmals überimpft werden

Es zeigte sich, dass nur Clarithromycin-resistente Klone erzeugt werden konnten, wenn zuerst mit Kanamycin auf das Plasmid selektiert wurde und anschließend die Kulturen in Selektivmedium mit Clarithromycin überimpft wurden. Bei weiterer Selektion mit Kanamycin konnte kein oder nur sehr langsames Wachstum beobachtet werden. Nach 2 – 5 Tagen konnte eine deutliche Trübung des Mediums beobachtet werden und die Kulturen wurden in neues Selektivmedium überimpft und mittels Agarshakes vereinzelt. Von den gepickten Klonen wurde genomische DNA isoliert.



**Abb. 45: Nachweis von pCH6R574 in *C. ljungdahlii*-Kulturen:** A: Nachweis des Plasmids pCH6R574 durch PCR auf genomischer DNA von *C. ljungdahlii* Kulturen. Die DNA wurde aus der 2. Passage in Medium mit 1µg/mL Kanamycin isoliert (siehe Tab. 45); B: Nachweis des Plasmids pCH6R574 durch PCR auf genomischer DNA von *C. ljungdahlii* Kulturen. Die DNA wurde aus der 6. Passage in Medium mit 1µg/mL Clarithromycin isoliert. Erklärung der Banden in den Bildern und der verwendeten Primer im Text. Der Standard in beiden Gelbildern ist der 1kb-ladder von Fermentas

Mittels PCR mit Plasmid-spezifischen Primern wurde auf die Anwesenheit des Plasmids getestet. Dafür wurde einerseits DNA von einer Kultur isoliert, die in Anwesenheit von 1µg/mL Kanamycin im Medium gewachsen ist (Abb. 45 Bild A), andererseits von einer Kultur, die nicht mehr resistent gegenüber Kanamycin ist, jedoch mit 1µg/mL Clarithromycin im Medium wachsen kann (Abb. 45 Bild B). Eine Kanamycin-Resistenzgen (*kanR*) befindet sich auf dem Plasmid pCH6R574, das Clarithromycin-Resistenzgen (*ermB*) ist aktiv, wenn das Gruppe II Intron in das Genom integriert ist (siehe 3.3.7). Es wurden verschiedene Genom- bzw. Plasmid-spezifische Primer verwendet, um zu überprüfen, ob das Plasmid noch in den Zellen vorhanden ist bzw. ob das Intron in die Zielsequenz integriert ist. Abb. 45 Bild A zeigt die PCR-Produkte bei einer Kultur mit pCH6R574, die mit Kanamycin angezogen wurde. In Spur 2 wurde eine 1,5 kb große Teilsequenz von *rnfC* aufgetragen (amplifiziert mit den Primern *rnf\_fwd\_58* und *rnfC\_rev\_1504*). Wenn das Intron in die Zielsequenz integriert wäre, würde das Produkt eine Größe von 3,3 kb aufweisen. In Spur 3 wurde eine 200 bp lange Sequenz der Betain-Reduktase Untereinheit B  $\alpha$  (CLJU\_c27840) als Positivkontrolle aufgetragen (amplifiziert mit den Primern *B246\_check\_fwd* und *B246\_check\_rev*). Mit den Intron-spezifischen Primern *RAM\_check\_fwd* und *pRAMcheck\_rev* wurde ausschließlich auf das Intron getestet (siehe Spur 4). Auf dem Plasmid hat das Produkt eine Größe von 2,2 kb, ins Genom integriert wird das Gruppe I Intron herausgespleißt und das Produkt besitzt eine

Größe von 1,8 kb. Spur 4 zeigt ein Hauptprodukt von ca. 2,2 kb mit einer schwachen Bande bei ca. 1,8 kb. Dies bedeutet, dass das Gruppe II Intron schon vereinzelt in das Genom inseriert sein könnte. In den Spuren 5 - 7 sind Plasmid-spezifische PCR-Produkte aufgetragen: Spur 5 zeigt ein PCR-Produkt über den Promotor des Kanamycin-Resistenzgens *kanR* (amplifiziert mit pKan\_check\_R und pCH5\_Hyb\_F1), in Spur 6 wurde das Produkt für das Gen *ltrA* (Transposase) aufgetragen (amplifiziert mit pltrA\_check\_fwd und pMTL\_ltrA\_rev) und in Spur 7 sieht man das 2,9 kb große PCR-Produkt des Gruppe II Introns, amplifiziert mit den Plasmid-spezifischen Primern pCH5\_check\_fwd und pCH5\_check\_rev.

Außerdem wurden PCRs mit Genom- und Plasmid-spezifischen Primern mit genomischer DNA von Zellen mit pCH6R574 gemacht, die in Medium mit Clarithromycin gewachsen sind. Abb. 45 Bild B zeigt die verschiedenen Ergebnisse. Auf Spur 2 wurde die Reaktion mit den Plasmid-spezifischen Primern für die Promotorregion des *kanR*-Gens von pCH6R574 aufgetragen (amplifiziert mit pKan\_check\_R und pCH5\_Hyb\_F1). Diese Reaktion hat vermutlich aufgrund von fehlenden Template kein Produkt ergeben. Ebenso konnte kein Produkt detektiert werden bei der Amplifikation von *ltrA* mit den Primern pltrA\_check\_fwd und pMTL\_ltrA\_rev, die ebenfalls auf dem Plasmid binden (Spur 4). In Spur 3 wurde in einer PCR das Gruppe II Intron mit Intron-spezifischen Primern (RAM\_check\_fwd und pRAMcheck\_rev) amplifiziert. Hier zeigt sich im Unterschied zu Spur 4 von Bild A, dass die kleinere Bande bei ca. 1,8 kb in dieser Reaktion stärker hervortritt. Dies lässt vermuten, dass das Intron Genom integriert ist. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass mit den Plasmid-spezifischen Primern keine Produkte mehr erhalten werden. Jedoch ist das Intron nicht in die Zielsequenz inseriert, da das PCR-Produkt von *rnfC* (mit den Primern rnf\_fwd\_58 und rnfC\_rev\_1504) mit ca. 1,5 kb die gleiche Größe wie beim Wildtyp aufweist (Spur 5). Spur 6 zeigt das PCR-Produkt von *atpB* (amplifiziert mit den Primern atpB\_fwd und atpB\_rev), das als Positivkontrolle der PCR gedient hat.

Zumindest eine Passage auf Kanamycin ist notwendig, damit das Gruppe II Intron in das Genom inserieren kann. Bei Versuchen, sofort auf Clarithromycin-resistente Zellen zu selektieren, wurden keine positiven Klone erhalten.

Die Insertion in die Zielsequenzen im Genom sollte über PCR bestimmt werden. Dafür wurden genomische Primer verwendet, die ein Produkt über die Insertionsstellen amplifizieren. Bei korrekter Insertion wären die PCR-Produkte jeweils 1,8 kb länger als beim Wildtyp. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden (siehe Abb. 45, Bild A Spur 2, Bild B Spur 5). Bei Nachweis auf das Vorhandensein des Gruppe II Intron wurden Produkte mit

Intron-spezifischen Primern amplifiziert. Wenn es nicht in das Genom inseriert ist, entsteht ein Produkt von 1,2kb, wenn eine Insertion stattgefunden hat, fehlte das Gruppe I Intron und man erhielt ein Produkt bei 800bp. Nach mehreren Überimpfungen in Medium mit 1µg/mL Clarithromycin konnte nur noch ein Produkt von 800bp amplifiziert werden. Dieses wurde aufgereinigt und durch Sequenzierung bestätigt, dass die DNA-Sequenz korrekt ist und sich das Gruppe I Intron herausgespleißt hat (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.4. Untersuchungen zum Rnf-Komplex bei *C. ljungdahlii*: Bestimmung der Operonstruktur und des Transkriptionsstartpunkts

Der Rnf-Komplex ist ein zentraler Bestandteil der Bioenergetik in acetogenen Bakterien wie *C. ljungdahlii*. Diese NAD:Ferredoxin-Oxidoreduktase katalysiert vermutlich die einzige bisher identifizierte, membrangebundene Reaktion. Im Genom von *C. ljungdahlii* konnten Gene für einen Rnf-Komplex identifiziert werden (*rnfCDGEAB*; CLJU\_c11360-410). Zusätzlich ist *upstream* von *rnfC* ein Regulator (CLJU\_c11350) lokalisiert, der mit den Genen des Rnf-Komplexes assoziiert ist. Bei Analyse der Microarray-Experimente, konnte zwischen den einzelnen Bedingungen keine Regulation der *rnf*-Gene festgestellt werden. Bei manchen Experimenten zeigte sich jedoch eine Regulation in der Genexpression des Regulatorgens. Daraufhin wurde die Operonstruktur des Genclusters mit *rnfCDGEAB* untersucht. RNA aus autotrophen und auf Fruktose gewachsenen Zellen wurde isoliert. Mittels reverser Transkription mit Primern, die spezifisch für den Rnf-Komplex waren, wurden überlappende PCR-Produkte über die gesamte Länge des mutmaßlichen Operons amplifiziert (Produktschema und zugehörige Primer siehe Tab. 49).

Dabei wurden auch PCRs mit Primern durchgeführt, die außerhalb des Operons liegen und somit kein Produkt ergeben (siehe Abb. 46). Um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden die Experimente gleichzeitig mit derselben RNA, jedoch mit Phire-Polymerase ohne Reverse Transkriptase ausgeführt. Dadurch konnte die Reinheit der RNA bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).



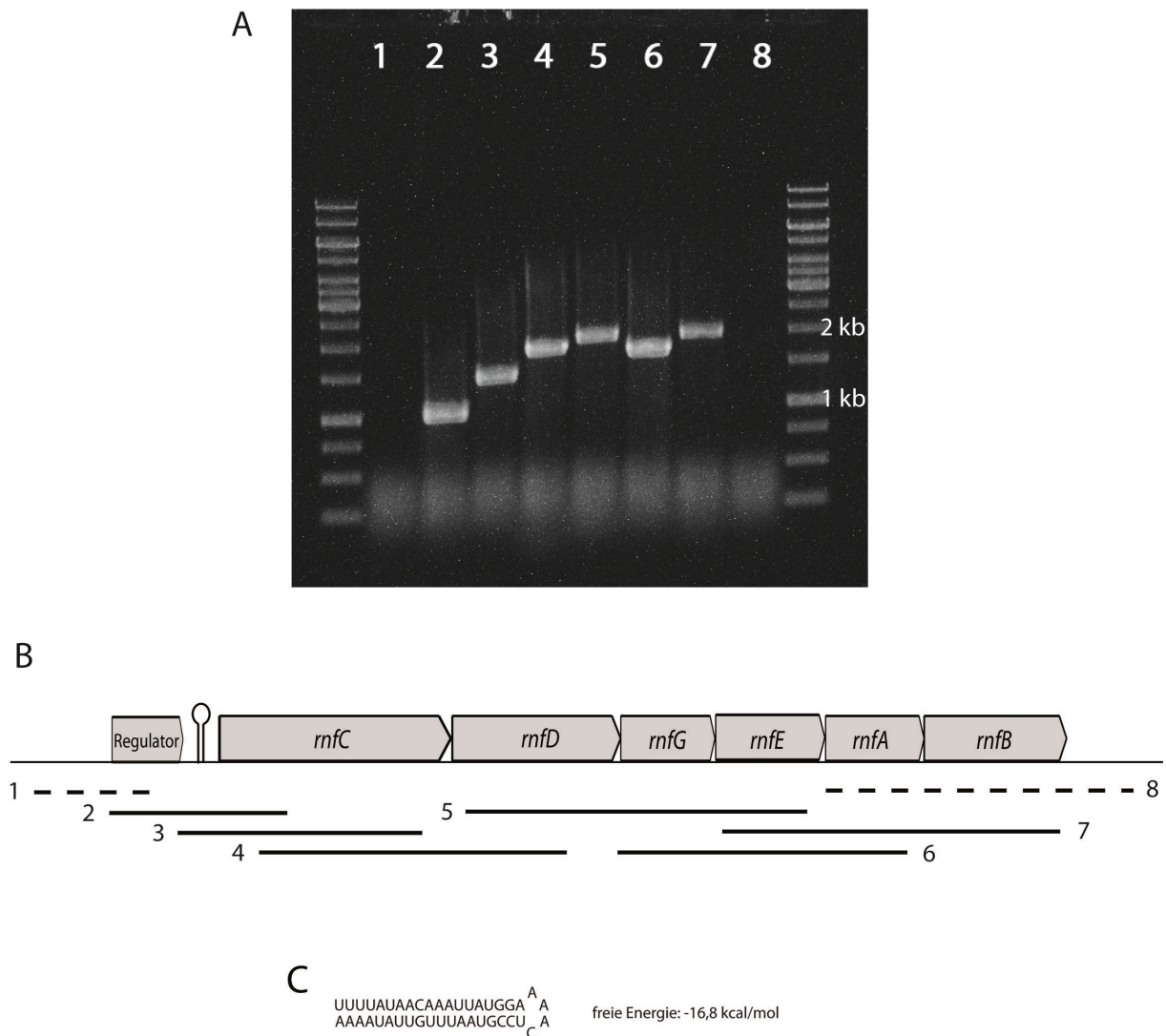
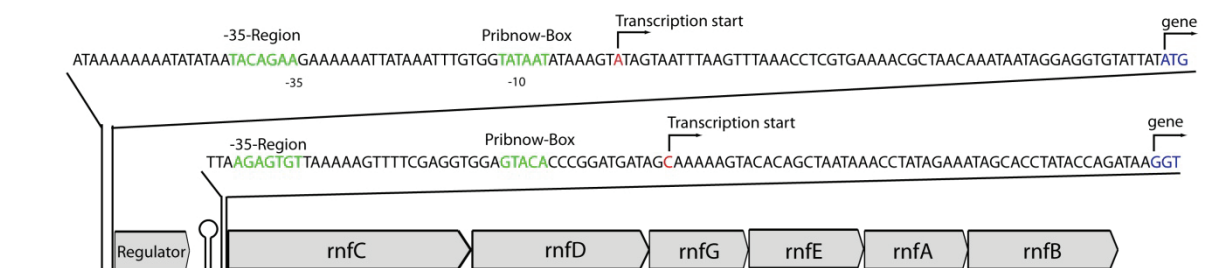


Abb. 46: **Analyse der Operonstruktur der *rnf*-Gene:** **A:** Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Reversen Transkription über das Operon der Gene des Rnf-Komplexes. Die RT-PCR-Produkte sind analog der skizzierten PCR-Produkte in **B** nummeriert. Größenstandard: 1 kb-Leiter von Fermentas; **B:** Anordnung der Gene des Rnf-Komplexes inkl. CLJU\_c11350, das für einen Regulator kodiert. Die Banden unter dem Schema skizzieren die Lage der PCR-Produkte, gestrichelte Linien bedeuten, dass hier kein Produkt amplifiziert werden konnte. Zwischen Regulator und *rnfC* ist eine identifizierte Haarnadelstruktur eingezeichnet; **C:** Sequenz der Haarnadelstruktur und Energiegehalt

Durch die reverse Transkription konnte gezeigt werden, dass die Gene des Rnf-Komplexes mit dem Regulator in einem Operon liegen. Da jedoch die intergene Region zwischen dem Regulator und *rnfC* mit 306bp verhältnismäßig groß ist für Gene in einem Operon, wurde diese Region genauer überprüft. Bei Analyse der Sequenz mit dem Programm „Clone Manager 9.03“ (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) wurde eine Haarnadelstruktur entdeckt, die 99bp hinter CLJU\_c11350 beginnt und 42bp umfasst. Diese lange intergene Region und die deutliche Haarnadelstruktur deuten auf einen Terminator hin.

Deshalb wurde der Transkriptionsstartpunkt des Transkripts mittels 5'-RACE bestimmt (siehe 2.9). Für die Amplifikation der Produkte wurden Adapter-spezifische Primer (im RLM-RACE Kit schon vorhanden) und genspezifische Primer benötigt. Die genspezifischen Primer wurden so gewählt, dass sie am Anfang des Regulatorgens (RACE\_reg\_outer und RACE\_reg\_inner) bzw. am Anfang von *rnfC* (RACE\_rnf\_712\_rev und RACE\_rnf\_807\_rev) lagen.

Die schwachen Banden der PCRs wurden aufgereinigt und über *nested*PCR nochmals amplifiziert, damit genügend Produkt für eine Sequenzierung vorhanden war. Da die Sequenzierung für den Transkriptionsstartpunkt vor *rnfC* vor der Adaptersequenz mehrmals abgebrochen war, wurde dieses PCR-Produkt in pUC19 subkloniert und mit plasmidspezifischen Primern (pUC19\_fwd und pCH1\_check\_rev) sequenziert.



**Abb. 47: Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte des *rnf*-Operons:** dargestellt sind die Sequenzen vor dem Regulatorgen (CLJU\_c11350) und *rnfC*. In grün sind die mutmaßlichen -35-Regionen und Pribnow-Boxen, in rot der Transkriptionsstart und in blau der Genanfang dargestellt.

Es konnten zwei Transkriptionsstartpunkte bestimmt werden, wie in Abb. 47 dargestellt ist. Der erste Transkriptionsstartpunkt liegt 57bp vor CLJU\_c11350 und konnte mit genspezifischen Primern (RACE\_reg\_outer und RACE\_rnf\_712\_rev), die in CLJU\_c11350 und auch in *rnfC* liegen bestimmt werden, so dass der Regulator ein Teil des Operons ist. Zusätzlich gibt es einen weiteren Transkriptionsstartpunkt 51bp vor dem Genanfang von *rnfC*, von dem aus ein weiteres Transkript der Gene des Rnf-Komplexes synthetisiert werden kann.

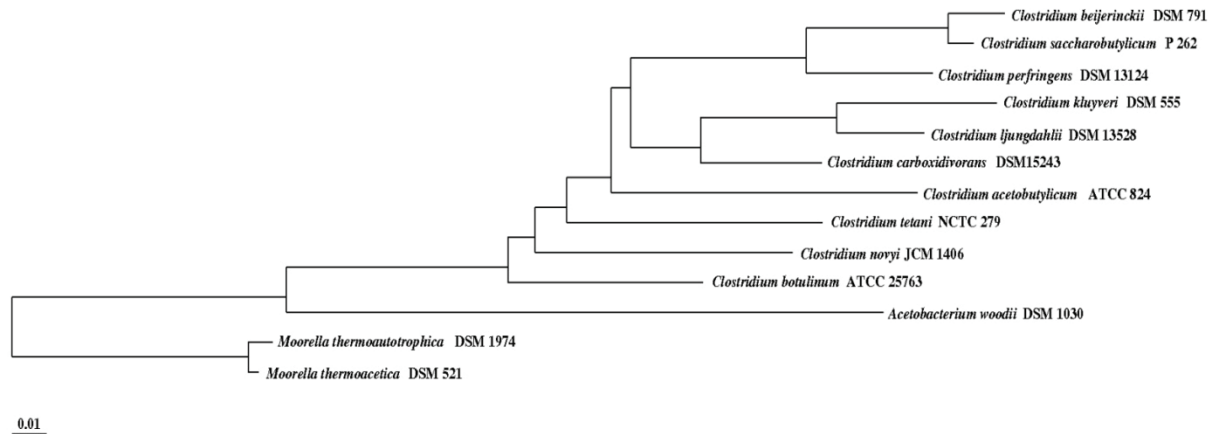
## 4. Diskussion

### 4.1. Das Genom von *C. ljungdahlii*

#### 4.1.1. Allgemeiner Vergleich des Genoms von *C. ljungdahlii* mit anderen Clostridien

Der Genus *Clostridium* ist eine sehr heterogene Gruppe an Organismen in Bezug auf Stoffwechsel, Pathogenität oder auch Genomgröße. Die gemeinsamen Charakteristika dieser Gattung sind der anaerobe Stoffwechsel, die Fähigkeit Endosporen zu bilden, der Gram-positive Zellwandaufbau und ihre Unfähigkeit zur dissimilatorischen Sulfat-Reduktion (Wiegel *et al.*, 1981). Durch 16S rRNA-Sequenzanalysen wurden die Mitglieder der Gattung in 19 Cluster eingeteilt, wobei die meisten pathogenen, aber auch viele nicht-pathogene Arten in Cluster I eingeordnet wurden (Collins *et al.*, 1994). Auch *C. ljungdahlii* wird anhand der 16S-Sequenzen zu Cluster I gezählt (Tanner *et al.*, 1993).

Abb. 48 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum, der die Verwandtschaftsverhältnisse von *C. ljungdahlii* mit verschiedenen anderen Clostridien aus Cluster I und den homoacetogenen Arten *A. woodii* und *C. thermoacetica* darstellt. Die größte Ähnlichkeit in der 16S-Sequenz besitzt *C. ljungdahlii* mit *C. kluyveri*. Ein Vergleich der beiden Organismen auf Genomebene bestätigte zum einen diesen Punkt, dass die beiden Organismen sich genetisch nahe stehen, liefert zum anderen aber auch einen deutlichen Hinweis auf die große Heterogenität in der Gruppe der Clostridien. Für knapp die Hälfte (49,7%) der wertvollen Gene von *C. ljungdahlii* findet sich keine Entsprechung in *C. kluyveri*. Die Diversität innerhalb der Gattung *Clostridium* veranschaulicht auch ein Blick auf den Stoffwechsel der beiden Organismen. *C. kluyveri* kann, anders als *C. ljungdahlii*, auf Acetat und Ethanol wachsen und produziert dabei Butyrat, Caproat und Wasserstoff (Barker, 1937). Darüber hinaus lässt sich mit Hilfe des BiBaG-Tools (Wollherr, 2010) feststellen, dass je entfernter die Verwandtschaft zwischen zwei Arten ist, desto weniger Gene besitzen Orthologe (Tab. 7). Obwohl *C. ljungdahlii* und *M. thermoacetica* als Homoacetogene äußerlich dem gleichen Stoffwechseltyp angehören, besitzen sie nur 138 orthologe Gene, und die meisten dieser Orthologen sind ribosomalen oder *house-keeping* Genen zuzuordnen. All diese Beobachtungen bestätigen die große Diversität und Heterogenität unter den Vertretern der Gattung *Clostridium*.



**Abb. 48: Phylogenetische Beziehung verschiedener Clostridienarten auf Basis der Nukleotidsequenz ihrer 16S rDNA.** Dieses Dendrogramm wurde von Hedwig Kurka mit der ARB Software (Ludwig *et al.*, 2004) nach der „Maximum Likelihood“ Methode erstellt, mit der die evolutionäre Distanz der Organismen zueinander berechnet wurde.

#### 4.1.2. Das genetische Potential von *C. ljungdahlii* in Hinblick auf die Substratverwertung und Produktbildung

*C. ljungdahlii* wurde aus dem Mist eines Hühnerzuchtbetriebs isoliert, aufgrund seiner Fähigkeit Ethanol aus Synthesegas zu produzieren. Bei weiteren physiologischen Versuchen im Rahmen der Erstbeschreibung und folgender Veröffentlichungen wurde außerdem festgestellt, dass verschiedene Zucker wie verschiedene Hexosen und Pentosen und Säuren wie Gluconat verwertet werden können (Huhnke *et al.*, 2008; Tanner *et al.*, 1993). Durch die Sequenzierung und Annotation des Genoms von *C. ljungdahlii* kann man den Stoffwechsel rekonstruieren und die Abbauewege dieser C-Quellen nachvollziehen. Des Weiteren erhält man einen Einblick in das genetische Potential dieses Organismus und kann weitere Substrate austesten und identifizieren. In diesem Kapitel sollen das Habitat von *C. ljungdahlii* und die darin potentiell vorhandenen C- und N-Quellen in Zusammenhang mit den genetischen Möglichkeiten zur Verwertung dieser Substrate diskutiert werden. Ebenso wird ein Blick auf die Bildung von Acetat und Ethanol von *C. ljungdahlii* im Vergleich zur Lösungsmittelbildung bei *C. acetobutylicum* geworfen.

Clostridienarten sind sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch im Abfall von Hühnern zu finden. Da *C. ljungdahlii* aus dem Abfall eines Hühnerzuchtbetriebs isoliert wurde, ist der Organismus wahrscheinlich im Verdauungstrakt von Hühnern angesiedelt und lebt auch in deren Abfall. Da der Organismus Sporen bilden kann und es nur wenige Informationen zur

Isolierung gibt, ist der natürliche Lebensraum nicht genau definiert. Hühner haben im Gegensatz zum Menschen zwei große Blinddärme in denen Bakterien siedeln, die Faserstoffe aus der Nahrung aufschließen und so dem Huhn zur Verdauung zugänglich machen. Abhängig vom Futter der Hühner, kann das Nährstoffangebot für die Bakterien im Darm eine sehr komplexe Mischung aus u. a. Kohlehydraten, Fetten, Proteinen und für Hühner unverdaulichen Pflanzenbestandteilen darstellen (Wiemann, 2005). Diese werden vom Bakterienkonsortium im Darm weiter aufgespalten. Daher kann man annehmen, dass es ein großer Vorteil für Bakterien in einem solchen, unbeständigen Umfeld ist, ein großes Spektrum von C-Quellen verwerten zu können.

*C. ljungdahlii* kann aufgrund der Genausstattung verschiedene Einfachzucker verwerten. Man findet die komplette Genausstattung für den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, die Gluconeogenese, den reduktiven Zweig des Pentosephosphatwegs, in den auch die Zwischenprodukte des Gluconatabbaus eingeschleust werden können. Meist wird Gluconat über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut, jedoch konnten die Schlüsselenzyme (Phosphogluconat-Dehydratase bzw. Gluconat-Dehydratase) dieses Abbauwegs nicht im Genom gefunden werden (Ahmed *et al.*, 2005; Andreesen & Gottschalk, 1969; Conway, 1992). Zusätzlich kann man zwei Gencluster zum Abbau von Arabinose und Xylose identifizieren. Fruktose und Glukose kommen z. B. als Bestandteil von Saccharose oder als Monosaccharide in Früchten vor. Arabinose und Xylose sind Bestandteile der Hemicellulose (Scheller & Ulvskov, 2010) und können nach der Aufspaltung dieser Pflanzenbestandteile von *C. ljungdahlii* verwertet werden. Gluconat kommt u. a. in Honig und Wein vor und ist meist das Produkt Oxidation von Glukose durch Essigsäurebakterien wie *Acetobacter* oder *Gluconobacter* (Ramachandran *et al.*, 2006). Im Hinblick auf die Verwertung von komplexeren Kohlehydraten wie Stärke oder auch verschiedener Disaccharide wie Saccharose, Lactose oder Cellobiose konnten keine Gene für den Abbau dieser Substanzen gefunden werden. Im Gegensatz zu anderen bisher sequenzierten Arten von Clostridien konnten im Genom von *C. ljungdahlii* nur zwei Phosphotransferase-Systeme identifiziert werden. Beide Systeme sind spezifisch für Fruktose bzw. Mannitol. Das Fehlen weiterer PTS-Systeme, v. a. spezifisch für Glukose, könnte ein Faktor für das langsamere Wachsen von diesem Organismus auf Glukose sein. Mögliche Gründe für die Adaptionszeit von *C. ljungdahlii* bei Wachstum auf Glukose ließen sich anhand der Genomsequenz nicht finden, jedoch zeigten die Transkriptionsanalysen (siehe 3.2.7.2) einige interessante Unterschiede in der Genexpression bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zu Fruktose.

Zusätzlich zu den eben besprochenen Abbaumechanismen von Zuckern finden sich im Genom Gene für den Abbau von Aminosäuren oder deren Derivate. Die Aminosäure Glutamat kann über 3-Methylaspartat zu Ammonium, Acetat und Pyruvat reduziert werden (Glutamatfermentation). Ebenso besteht für *C. ljungdahlii* die Möglichkeit, Glycin mittels einer Glycin-Decarboxylase zu CO<sub>2</sub>, Methylen-THF und NAD(P)H zu verstoffwechseln. Die Produkte CO<sub>2</sub> und Methylen-THF können in den Wood-Ljungdahl-Weg eingeschleust und zu Acetat reduziert werden. Betain, ein Glycin-Derivat, das in der Zuckerrübe oder auch Brokkoli vorkommt, kann via Betainreduktase zu Trimethylamin und Acetat reduziert werden. Im Genom konnten sogar zwei sehr ähnliche Gencluster einer Betainreduktase inklusive Transporter und Thioredoxinsystem identifiziert werden. Wachstumsversuche bestätigten das Wachstum auf Glutamat. Bei der Kultivierung von *C. ljungdahlii* auf Glycin oder Betain als alleinige C-Quelle konnte kein Wachstum beobachtet werden. Der Organismus kann jedoch Betain nutzen, wenn Ethanol als Co-Substrat zugegeben wird.

Eine weitere potentielle C-Quelle stellen Methylgruppen von methoxylierten, aromatischen Verbindungen dar. Diese Verbindungen wie Kaffeesäure, Vanillinsäure oder Ferulasäure sind u. a. Bestandteil von Lignin. Lignine stellen eine Gruppe von Biopolymeren aus aromatischen Grundbausteinen dar, die in die pflanzliche Zellwand eingelagert sind und dadurch eine Verholzung bewirken. Die Basisbausteine sind Phenylpropanoide und können je nach Holzart variieren. Sie sind auch oft modifiziert, z. B. durch verschiedene Substituenten (Hydroxy-, Methoxy- oder Alkoxygruppen) an den aromatischen Bausteinen. Im Genom konnten verschiedene Gencluster identifiziert werden, die für O-Demethylierungssysteme kodieren könnten (siehe 3.1.10). Dabei werden Methylgruppen abgespalten und mittels eines Corrinoidproteins auf den Cofaktor THF übertragen, durch den es in den Wood-Ljungdahl-Weg eingeschleust werden kann. Solche Systeme wurden schon in *M. thermoacetica* und *A. woodii* beschrieben (Naidu D., 2001), und es wurde vermutet, dass diese Systeme einmal im Genom vorkommen und eine große Substratbandbreite an methoxylierten, aromatischen Verbindungen haben (Daniel *et al.*, 1991; Das A., 2007). Jedoch konnte mit der Genomsequenzierung gezeigt werden, dass *M. thermoacetica* – genauso wie *C. ljungdahlii* – mehrere Homologe der einzelnen Komponenten dieses O-Demethoxylierungssystems hat. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass diese jeweils auch spezifisch einzelne Substrate demethoxylieren. Ob und welche Substrate *C. ljungdahlii* mittels dieser mutmaßlichen O-Demethoxylierungssystemen verwerten kann, wurde bisher nicht ausgetestet oder untersucht. Jedoch sind Substrate in Form von pflanzlichen Faserresten wie Lignin im Verdauungstrakt von Hühnern bzw. in der Einstreu des Stalls vorhanden.

*C. ljungdahlii* wurde hauptsächlich aufgrund seiner Fähigkeit isoliert, autotroph mit CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und CO zu wachsen und aus diesen Edukten Acetat und Ethanol zu produzieren. Daraus resultiert auch die Fähigkeit aus einem Molekül Fruktose drei Moleküle Acetat zu synthetisieren, indem er das bei der Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat entstandene CO<sub>2</sub> wiederverwertet und zu einem Molekül Acetat oxidiert (Diekert & Wohlfarth, 1994). Homoacetogene Organismen wie *C. ljungdahlii* verwenden, ebenso wie anaerobe Sulfat-reduzierende oder methanogene Bakterien bzw. Archaeen, den Acetyl-CoA- oder Wood-Ljungdahl-Weg für die CO<sub>2</sub>-Assimilation (Martin, 2012; Ragsdale & Pierce, 2008). Es wird angenommen, dass dieser Stoffwechselweg einer der ältesten zur Fixierung von CO<sub>2</sub> ist, da hier gleichzeitig zur Assimilation von anorganischem Kohlenstoff Energie in Form von ATP generiert bzw. konserviert wird (Martin, 2012). Bei vielen Fermentationsprozessen wie der Vergärung von Kohlenhydraten bei *C. acetobutylicum* oder der gemischten Säuregärung bei Enterobakterien entstehen als Endprodukte CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>, die wiederum von Methanogenen oder Acetogenen verwertet werden können.

Im Genom von *C. ljungdahlii* kann man die Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs identifizieren. Diese sind in einem einzigen großen Cluster angeordnet, mit Ausnahme der Formiat-Dehydrogenasen, von denen drei Kopien im Genom vorhanden sind. Die Anordnung dieser Gene entspricht der in *C. difficile*, *C. carboxidivorans*, *C. bartlettii*, *A. metalliredigens* und der in den zu *C. ljungdahlii* sehr nah verwandten *C. autoethanogenum* und *C. ragsdalei* (3.1.2.1). Die Organisation dieser Gene in einem einzigen Gencluster konnte man bisher nur in Vertretern der Familie der Clostridiaceae identifizieren. So findet man z.B. bei den beiden am besten untersuchten Acetogenen – *M. thermoacetica* und *A. woodii*, die den Familien der Thermoanaerobacteriaceae bzw. der Eubacteriaceae zugeordnet werden – die Gene auf mehrere Loci in der Genomsequenz verteilt (Bruant *et al.*, 2010; Pierce *et al.*, 2008; Poehlein *et al.*, 2012).

Aus dem Endprodukt des Wood-Ljungdahl-Wegs, Acetyl-CoA, kann der Organismus zu einem Teil den benötigten Zellkohlenstoff gewinnen, zum anderen Teil wird es zu Acetat und Ethanol reduziert. Die Reduktion von Acetyl-CoA zu Acetat wird durch die zwei Enzyme Phosphotransacetylase (CLJU\_c12770) und Acetat-Kinase (CLJU\_c12780) katalysiert. Ethanol wird über Acetaldehyd gebildet. Es konnten zwei Gene für bifunktionale Alkohol-Dehydrogenasen/Acetaldehyd-Dehydrogenasen im Genom identifiziert werden, die sehr ähnlich zueinander und direkt nebeneinander lokalisiert sind. Vermutlich ist eine Kopie dieser Gene aus einer Duplikation entstanden. Daneben befinden sich noch mehrere andere ORFs im

Genom, die für Alkoholdehydrogenasen kodieren, jedoch kann man bei den meisten nur eine grobe Einteilung in die Enzymfamilie treffen, da keine Homologen in anderen Organismen genauer charakterisiert sind. Ausnahmen dazu bilden CLJU\_c18470, *adh1* und *adh2*, die eine hohe Ähnlichkeit zu einer NADPH-abhängigen Butanol-Dehydrogenase aus *C. saccharobutylicum* besitzen. Es ist bekannt, dass die Dehydrogenase bei diesem Organismus auch Ethanol als Substrat verwenden kann (Youngleson *et al.*, 1988). Da *C. ljungdahlii* kein Butanol produziert, wird hier vermutlich in erster Linie Ethanol als Substrat genutzt. Einen Hinweis, dass diese Enzyme auch hier zusätzlich Butanol als Substrat umsetzen können, liefert die Dissertation von Michael Köpke. Dort ist beschrieben, dass *C. ljungdahlii* 1-Butanol zu Butyrat umsetzen kann, wenn Fruktose als C-Quelle zur Verfügung steht (Köpke, 2009b).

Im Gegensatz zum biphasischen Stoffwechselverlauf von Acetogenese und Solventogenese bei lösungsmittelbildenden Clostridien konnten bei *C. ljungdahlii* keine Umstellung des Stoffwechsels und keine Änderung der Stoffwechselprodukte im Verlauf des Wachstums festgestellt werden. Acetat und Ethanol werden gleichzeitig gebildet (Najafpour & Younesi, 2006; Phillips *et al.*, 1994). Unterschiede im Verhältnis in dem beide Produkte gebildet werden, können auf verschiedenen Substraten beobachtet werden (Köpke, 2009b). Diese unterschiedlichen Präferenzen in der Produktbildung lassen sich allerdings nicht allein auf einzelne Substrate zurückführen, da bei gleichen Substraten und gleicher Medienzusammensetzung ebenfalls Unterschiede in der Produktbildung feststellbar waren. In dieser Arbeit konnte bei Wachstum mit Fruktose als C-Quellen keine oder nur eine sehr geringe Ethanolproduktion beobachtet werden, wohingegen Michael Köpke in seiner Dissertation eine Bildung von bis zu 15mM Ethanol messen konnte (Köpke, 2009b). Ein Faktor, der die Bildung von Ethanol fördert oder hemmt scheint der pH-Wert des Mediums zu sein. Liegt dieser bei Beginn der Kultivierung über 6,0, so scheint es, dass das Verhältnis bei der Bildung von Ethanol und Acetat zugunsten von Acetat verschoben ist (Gaddy & Clausen, 1992). Jedoch weiß man insgesamt wenig über die Faktoren, die die Produkt- bzw. Ethanolbildung bei *C. ljungdahlii* steuern, da der Organismus erst langsam in den Fokus der Biotechnologie rückt.

Neben den vielfältigen Möglichkeiten der Kohlenstoffverwertung offenbarte das Genom von *C. ljungdahlii* auch mehrere Systeme zur Verwertung von verschiedenen Stickstoffverbindungen. Hühnerkot und -mist hat einen hohen Anteil an Stickstoffverbindungen, wobei sich diese aus ca. 60% Harnsäure, 6% Ammoniumstickstoff,



2% Harnstoff und 32% Reststickstoff wie Abbauprodukte von Proteinen zusammensetzen (Nebel & Kühnel, 2010). Im Genom konnten neben den Genen zur Nutzung von Ammonium auch Gene für eine Molybdän-abhängige Nitrogenase (CLJU\_c04930-50) zur Fixierung von molekularem Stickstoff gefunden werden. Außerdem wurden Gene für eine als fermentativ beschriebene Nitratreduktase (CLJU\_c23710-30) identifiziert, die bisher nur in *C. perfringens* entdeckt wurde. Dieser Enzymkomplex unterscheidet sich stark von den Molybdän-abhängigen, assimilatorischen und dissimilatorischen Nitratreduktasen, die bisher v. a. in *E. coli*, *Paracoccus denitrificans* oder *R. capsulatus* charakterisiert wurden (Berks, 1995; Richardson *et al.*, 2001). In *C. perfringens* wurde diese Nitratreduktase weniger mit Nitratassimilation sondern vielmehr mit Energieproduktion in Verbindung gebracht (Fujinaga *et al.*, 1999). Bei Wachstumsstudien konnte *C. ljungdahlii* mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle wachsen und dieses somit auch assimilatorisch nutzen. Wurde bei autotrophen Wachstum Ammonium durch Nitrat ersetzt, wurde zudem eine Steigerung der Wachstumsrate und der maximalen Zelldichte erreicht, was auf eine zusätzliche assimilatorische Rolle des Enzyms hindeutet und darauf, dass Nitrat gleichzeitig als Elektronenakzeptor genutzt wird.

Bei Wachstumsversuchen im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich Harnsäure als Stickstoffquelle identifiziert werden (siehe 3.2.6). Harnsäure ist das Endprodukt des Purinabbaus und stellt einen Hauptanteil der Stickstoffverbindungen in Hühnerkot dar. *C. ljungdahlii* kann diese Verbindung – anders als *C. acidiurici* – nur als Stickstoffquelle nutzen und benötigt deshalb eine zusätzliche Kohlenstoffquelle wie z. B. Fruktose. In früheren Veröffentlichungen wurde zwar das Wachstum von *C. ljungdahlii* allein auf Guanin, Hypoxanthin und Xanthin beschrieben (Tanner & Laopaiboon, 1997), dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Der Abbau von Purinen und deren Abbauprodukten Xanthin, Hypoxanthin und Harnsäure in *C. acidiurici* und *C. cylindrosporum* wurde 1956 von J. C. Rabinowitz aufgeklärt. In seinen Arbeiten wurden die Zwischenprodukte und die beteiligten Enzyme und Cofaktoren beschrieben (Rabinowitz, 1956; Rabinowitz & Barker, 1956a, b; Rabinowitz & Pricer, 1956a, b).

Seitdem wurde jedoch sehr wenig über den Abbau von Xanthin zu Acetat, CO<sub>2</sub> und Ammonium bei Clostridien veröffentlicht. Da zur damaligen Zeit die Methoden der Protein- bzw. DNA-Sequenzierung nicht vorhanden waren, gibt es zu den Enzymen dieser Reaktionen nur allgemeine Informationen wie ihre Reaktionsmechanismen. Dies macht es schwierig, Gene für diesen Abbauweg zu identifizieren. Jedoch findet man im Genom von *C. ljungdahlii*

mehrere Gene, die für Purin-Deaminasen (CLJU\_c23940, CLJU\_c23960, CLJU\_c26120, CLJU\_c29900/29910), Amido-Hydrolasen (CLJU\_c23820, CLJU\_c26110, CLJU\_c30030), Deacetylasen (CLJU\_c23810, CLJU\_c29950) und Xanthin-Dehydrogenasen (CLJU\_c23880-23910, CLJU\_c29920-29940, CLJU\_c0990-09110) kodieren. Diese Gene sind meist zusammen im Genom lokalisiert und könnten eine Rolle im Purinabbau spielen.

Im Genom von *C. ljungdahlii* finden sich zusätzlich viele ORFs für nicht näher charakterisierte Enzyme, von denen nur eine sehr allgemeine Funktion bekannt ist und viele hypothetische ORFs, die für bisher unbekannte Enzyme oder andere Proteine kodieren können.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass im Genom von *C. ljungdahlii* meist Gene identifiziert werden konnten, die den Organismus zur Verwertung von eher einfachen Substraten wie Monosaccharide (Glukose, Fruktose, Xylose, Arabinose), Aminosäuren oder deren Derivaten (Glutamat, Betain) befähigt. Außerdem konnten Gene für O-Demethylierungssysteme gefunden werden, durch die eher ungewöhnliche Substrate wie Bestandteile von Lignin demethyliert werden können. Zusätzlich werden H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und CO verwertet. Diese Gase entstehen meist als terminale Stoffwechselprodukte u. a. bei Fermentationsprozessen von anderen anaeroben Organismen, z. B. *C. acetobutylicum*.

Die Ergebnisse der Genomanalyse hinsichtlich der möglichen Stoffwechselwege deckt sich mit den bisher bekannten Substraten, die *C. ljungdahlii* verwerten kann (Tanner & Laopaiboon, 1997; Tanner *et al.*, 1993). Daraus kann man schließen, dass *C. ljungdahlii* hauptsächlich einfache Verbindungen verwertet. Diese könnten aus der Nahrung des Huhns, aus der Aufspaltung von komplexeren Substraten wie Cellulose durch Exoenzyme anderer Organismen stammen oder auch die Stoffwechselendprodukte anderer Bakterien sein.

### 4.1.3. Energiekonservierung von *C. ljungdahlii* im Vergleich mit *M. thermoacetica* und *A. woodii*

Acetogene Organismen wie *C. ljungdahlii* sind unter den vielseitigsten anaeroben Bakterien bezüglich ihres Stoffwechsels. Viele von ihnen können heterotroph eine Vielzahl von organischen Substraten wie Zucker, Fruchtsäuren, manche Aminosäuren oder Alkohole verwerten. Zusätzlich haben sie die Möglichkeit autotroph auf CO, CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> wachsen. Die Hexosen werden über die Glykolyse und die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-

CoA und CO<sub>2</sub> aufgespalten. Das Acetyl-CoA wird weiter via Acetyl-Phosphat zu Acetat reduziert. Diese Stoffwechselwege und Reaktionen sind gekoppelt mit der Netto-Synthese von vier ATP durch Substratkettenphosphorylierung.

ATP wird dabei direkt durch die Übertragung einer Phosphatgruppe eines phosphorylierten Intermediats auf ADP synthetisiert. Bei einem acetogenen Organismus wird das CO<sub>2</sub>, das bei der Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, zusätzlich über den Wood-Ljungdahl-Weg zu Acetat reduziert. Dabei entsteht zwar im Verlauf der CO<sub>2</sub>-Reduktion ein Molekül ATP durch die Reaktion der Phosphotransacetylase, dieses wird aber an anderer Stelle durch die Formyl-THF-Synthetase wieder verbraucht. Bei autotrophem Wachstum geschieht keine Netto-ATP Synthese (Schmidt *et al.*, 2009).

Während bei heterotrophem Wachstum ATP daher über Substratkettenphosphorylierung generiert wird, findet bei autotrophem Wachstum keine Glykolyse und somit auch keine ATP-Synthese über Substratkettenphosphorylierung statt. So müssen acetogene Organismen einen anderen Weg finden, um Energie zu generieren und konservieren. Dies geschieht über die Generierung eines chemiosmotischen Ionengradienten über die Zellmembran, durch den wiederum eine ATP-Synthase angetrieben wird. Hinsichtlich der Energiekonservierung durch chemiosmotische Prozesse werden Acetogene in H<sup>+</sup>-abhängige und Na<sup>+</sup>-abhängige Organismen unterteilt.

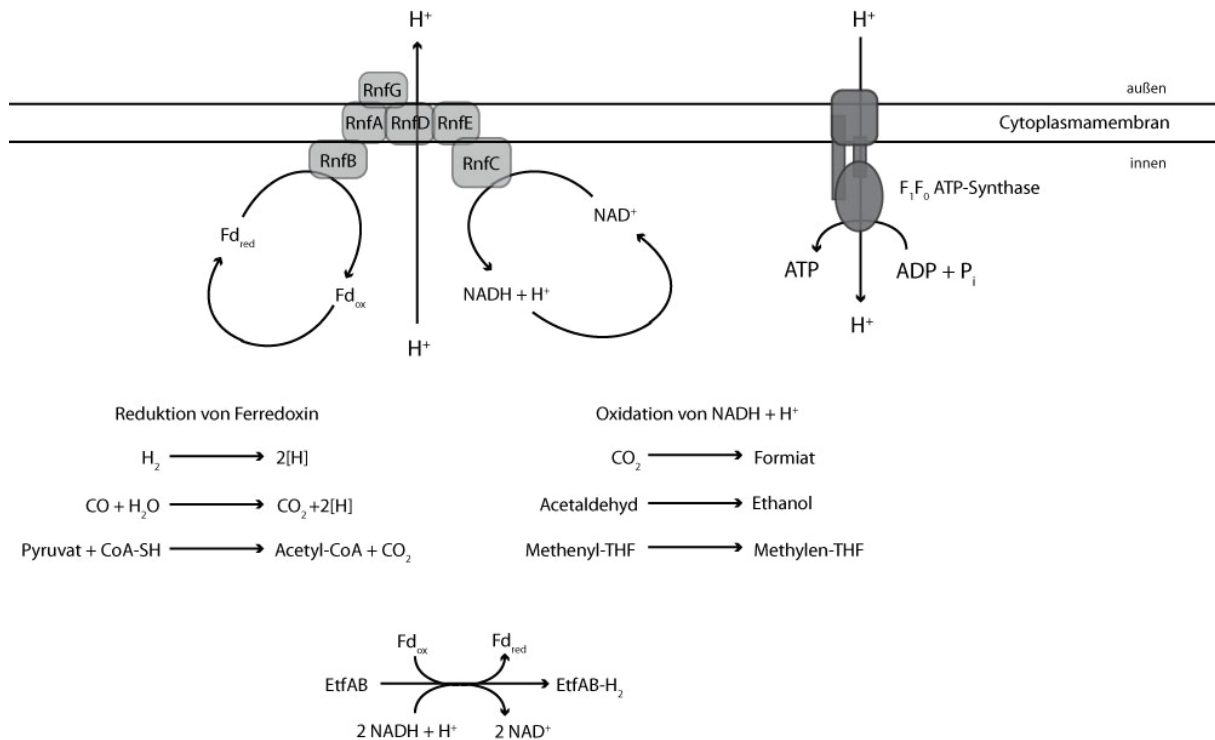
Der H<sup>+</sup>-abhängige Energiestoffwechsel wurde hauptsächlich an *M. thermoacetica* aufgeklärt. In diesem Organismus wurde ein elektrochemisches Membranpotential nachgewiesen, das auf Protonen basiert (Baronofsky *et al.*, 1984). Für die Generierung dieses Gradienten nutzt *M. thermoacetica* membrangebundene Elektronenüberträger, die die *b*-Typ-Cytochrome *b*<sub>559</sub> und *b*<sub>554</sub> und das Menaquinon MK7 einschließen (Das *et al.*, 1989; Das & Ljungdahl, 2003; Gottwald *et al.*, 1975). Als weitere Elektronenüberträger könnten Ferredoxin und Rubredoxin fungieren (Yang *et al.*, 1980). Ein eindeutiges Bindeglied zu den Enzymen des Wood-Ljungdahl-Wegs konnte bisher nicht identifiziert werden, obwohl Thauer *et al.* (1977) vorschlugen, dass die Methylen-THF-Reduktase das letzte Glied einer Elektronentransportkette sein könnte, die Elektronen von einem Donor wie einer Hydrogenase mittels der membrangebundenen Elektronentransportkette auf Methylen-THF überträgt. Dieser Elektronentransport könnte zum Aufbau eines protonenabhängigen Membranpotentials genutzt werden, durch das die ATP Synthese angetrieben werden könnte. Es konnte gezeigt werden, dass während der Oxidation von CO unter der Reduktion von Ferricyanid in Membranvesikeln ein Protonengradient aufgebaut werden kann (Hugenholtz *et al.*, 1987).

Ebenso konnte eine  $F_1F_0$ -ATP-Synthase identifiziert werden, die diesen Protonengradienten nutzen kann (Das & Ljungdahl, 1997; Ivey & Ljungdahl, 1986).

Im Gegensatz dazu bauen  $Na^+$ -abhängige Acetogene ein chemiosmotisches Membranpotential mit  $Na^+$ -Ionen auf. Vertreter dieser Gruppe besitzen membrangebundene Corrinoidproteine (Dangel *et al.*, 1987) und eine  $Na^+$ -translozierende ATP-Synthase (Reidlinger & Müller, 1994). Außerdem wurde bei *A. woodii* (Heise *et al.*, 1989), *Thermoanaerobacter kivui* (Yang & HL, 1990) und *Blautia producta* (Geerligs *et al.*, 1989) jeweils eine strikte  $Na^+$ -Abhängigkeit der Acetogenese und des autotrophen Wachstums nachgewiesen. Der membrangebundene Komplex, der die  $Na^+$ -Ionen über die Membran transloziert, war lange Zeit unbekannt, da diese Gruppe von Acetogenen keine Cytochrome oder Quinone besitzt (Poehlein *et al.*, 2012). Jedoch wurde bei *A. woodii* eine membrangebundene Ferredoxin: $NAD^+$ -Oxidoreduktase (Rnf-Komplex) identifiziert, durch die Elektronen von reduziertem Ferredoxin auf  $NAD^+$  übertragen und gleichzeitig durch Ausschleusen von  $Na^+$  ein Ionengradient aufgebaut werden kann (Biegel & Müller, 2010; Schmidt *et al.*, 2009). Dabei wird ein Redoxbereich von ca. -500 mV (Redoxpaar  $Fd_{ox}/Fd_{red}$ ) bis -320 mV (Redoxpaar  $NAD^+/NADH + H^+$ ) genutzt (Schmidt *et al.*, 2009).

*C. ljungdahlii* scheint keiner der beiden Gruppen anzugehören. Der Organismus kann autotroph auch ohne  $Na^+$ -Ionen wachsen. Nach ersten Versuchen auf  $Na^+$ -Abhängigkeit bei heterotrophen Wachstum (siehe 3.2.2), wurden weitere Versuche zur  $Na^+$ -Abhängigkeit auch bei autotrophen Wachstum auf  $H_2/CO_2$  bzw. Synthesegas von Michael Köpke am Institut für Mikrobiologie in Ulm bei Prof. Dürre durchgeführt. In Freising standen zu diesem Zeitpunkt nicht die Möglichkeiten für die Kultivierung unter autotrophen Bedingungen zur Verfügung. Im Gegensatz zu *A. woodii*, der bei Konzentrationen unter 5 mM ein signifikant schlechteres und bei Natriumkonzentrationen unter 2,5 mM kein Wachstum mehr aufweist (Heise *et al.*, 1989), konnte bei *C. ljungdahlii* auch bei 1,4 mM Natriumionen kein Effekt auf das autotrophe Wachstum nachgewiesen werden (Köpke, 2009b). Ein weiterer Hinweis auf die Ausbildung eines Protonenpotentials über die Membran liefert die Sequenzanalyse der ATP-Synthase, da die konservierten Koordinationsstellen für  $Na^+$ -Ionen in der *c* Untereinheit (*atpE*) fehlen (Meier *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu *M. thermoacetica* konnten bei der Genomanalyse keine Gene für Cytochrom- oder Quinonbiosynthese identifiziert werden, die Voraussetzung für das Vorhandensein einer Elektronentransportkette analog zu *M. thermoacetica* wäre. Jedoch besitzt *C. ljungdahlii* Gene für eine Ferredoxin:  $NAD^+$ -Oxidoreduktase homolog zu denen in *A. woodii*. Dieser Enzymkomplex könnte am Aufbau

eines chemiosmotischen Membranpotentials beteiligt sein, das für die Energiekonservierung durch die ATP Synthase genutzt werden könnte (siehe Abb. 49).



**Abb. 49: Modell der Energiekonservierung in *C. ljungdahlii*.** Reduziertes Ferredoxin (z. B. aus der Oxidation von H<sub>2</sub>) wird Generierung eines Protonengradienten und von NADH genutzt, das wiederum bei der Reduktion von CO<sub>2</sub> und der Bildung von Ethanol verbraucht wird.

Reduziertes Ferredoxin kann bei den Reaktionen der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, der Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase, der Hydrogenase oder der CO-Dehydrogenase erzeugt werden. Die Elektronen könnten am Rnf-Komplex auf NADH + H<sup>+</sup> übertragen werden, das wiederum u. a. im Verlauf des Wood-Ljungdahl-Wegs reoxidiert werden kann. Auch eine Verbindung von Reaktionen des Wood-Ljungdahl-Wegs mit der Energiekonservierung wäre möglich, da die Reduktion von Methylen-THF zu Methyl-THF durch die Methylen-THF-Reduktase und die anschließende Übertragung der Methylgruppe auf das Corrinoid-Fe-S-Protein durch die Methyltransferase jeweils stark exergone Reaktionen sind (Drake *et al.*, 2006; Müller, 2003; Müller *et al.*, 2001; Ragsdale & Pierce, 2008). In *C. formicoaceticum* konnte Ferredoxin bzw. FAD als Cofaktor der Methylen-THF-Reduktase identifiziert werden (Clark & Ljungdahl, 1984).

Somit könnte *C. ljungdahlii* einen neuen Typ der Energiegewinnung repräsentieren, da der Organismus Merkmale von sowohl  $H^+$ -abhängigen als auch  $Na^+$ -abhängigen Vertretern der Acetogenen aufweist. Es besitzt eine  $H^+$ -abhängige ATP-Synthase und kann Natrium-unabhängig sowohl heterotroph als auch autotroph wachsen, besitzt jedoch statt Cytochromen und Quinonen einen membranständigen Rnf-Komplex zur Generierung eines Ionengradienten.

Auch der Komplex I (NDH-Typ NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase) der Atmungskette ist beschrieben worden als Elektronentransportkomplex, der sowohl  $H^+$ - als auch  $Na^+$ -Ionen über die Membran transportieren kann (Hirst, 2003; Stolpe & Friedrich, 2004). Hier wurde jedoch in *E. coli* und *Rhodothermus marinus* gezeigt, dass der  $Na^+$ -Transport entgegen der Richtung des  $H^+$ -Transports erfolgt und den Protonenefflux fördert (Batista *et al.*, 2010; Batista & Pereira, 2011). Dies lässt den Schluss zu, dass Komplex I zwei Aktivitätszentren besitzt, von denen eine die Funktion einer Protonenpumpe besitzt, während das andere als  $Na^+/H^+$ -Antiporter fungiert (Batista & Pereira, 2011). Jedoch scheinen nicht alle Bakterien einen Komplex I mit beiden Aktivitätszentren zu besitzen, da bei *Paracoccus denitrificans* die Antiporteraktivität zu fehlen scheint und der Enzymkomplex vollständig  $Na^+$ -unabhängig ist (Batista & Pereira, 2011). In alkaliphilen *Bacillus*-Spezies wie *Bacillus halodurans* (Hamamoto *et al.*, 1994; Krulwich *et al.*, 2001) oder *Bacillus pseudofirmus* (Morino *et al.*, 2010) aber auch halotoleranten Cyanobakterien (Blanco-Rivero *et al.*, 2009; Fukaya *et al.*, 2009) wurde ein  $Na^+/H^+$ -Antiporter (Mrp), bestehend aus sieben Untereinheiten, identifiziert, der Homologien zu Untereinheiten von Komplex I (NuoLMN) aufweist (Mathiesen & Hägerhäll, 2002). Auch bei *Klebsiella pneumoniae* gezeigt, dass eine NDH-Typ NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase homolog zum Komplex I der Atmungskette bei Wachstum auf Citrat exprimiert wird, die als  $Na^+$ -Pumpe fungieren könnte (Krebs *et al.*, 1999), jedoch konnte dies nicht unzweifelhaft nachgewiesen werden (Bertsova & Bogachev, 2004). Eine weitere NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase (Nqr), die keine Sequenzähnlichkeiten zu Komplex I aufweist (Barquera *et al.*, 2002), sondern evolutionär mit dem Rnf-Komplex verwandt ist, vermittelt den Transport von  $Na^+$ -Ionen über die Membran. Hier gibt es keine Anhaltspunkte, dass dieser Enzymkomplex auch Protonen transportiert (Steuber, 2001; Tokuda & Unemoto, 1984; Verkhovsky & Bogachev, 2010).

Aufgrund der Anhaltspunkte, dass *C. ljungdahlii* einen auf Protonen basierenden Energiestoffwechsel und einen Rnf-Komplex besitzt, sollte man die Möglichkeit überdenken, die acetogenen Arten hinsichtlich ihrer Energiekonservierung nicht mehr nur anhand ihrer  $H^+$ -

bzw.  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit zu klassifizieren, sondern die Organismen vielmehr zuerst aufgrund des Mechanismus zur Ausbildung eines chemiosmotischen Membranpotentials zu klassifizieren: Arten, die mit Hilfe einer Elektronentransportkette mit Cytochromen und Quinonen und Arten, die mit Hilfe des Rnf-Komplex ein chemiosmotische Potential über die Membran aufbauen.

Neben der Substratkettenphosphorylierung und dem Aufbau eines chemiosmotischen Ionengradienten haben neuere Forschungen gezeigt, dass es eine dritte Art von Energiekonservierung gibt: *electron bifurcation*. Dabei wird eine energetisch ungünstige, endergone Reaktion durch eine gekoppelte, exergone Reaktion angetrieben. Es sind jedoch weder hochenergetische Verbindungen wie Thioester oder Anhydride noch ein chemiosmotischer Ionengradient beteiligt. Vielmehr ist ein lösliches Ferredoxin als Elektronenakzeptor an der Reaktion beteiligt, das anschließend am Rnf-Komplex reoxidiert werden kann (Martin, 2012). Ein Beispiel sind die Elektronentransfer Flavoproteine (EtfAB), die bei *C. kluyveri* zusammen mit der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd) die Reduktion von Butyryl-CoA zu Crotonyl-CoA durch NADH katalysieren. Dabei werden die beiden Elektronen von NADH via EtfAB aufgeteilt, wobei ein Elektron auf den positiveren Elektronenakzeptor Butyryl-CoA-Dehydrogenase und anschließend auf Crotonyl-CoA und ein Elektron auf den negativeren Elektronenakzeptor Ferredoxin übertragen wird. So werden zwei NADH zur vollständigen Reduktion von jeweils einem Butyryl-CoA und Ferredoxin benötigt (Herrmann *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). In *A. woodii* konnte eine Beteiligung von EtfAB bei der Reduktion von Caffeyl-CoA zu Hydrocaffeyl-CoA durch eine Caffeyl-CoA-Reduktase nachgewiesen werden (Imkamp *et al.*, 2007). Auch in *C. ljungdahlii* könnten Elektronentransfer-Flavoproteine an der Energiekonservierung beteiligt sein, da im Genom fünf *etfAB*-Paare identifiziert werden konnten. Drei *etfAB*-Paare sind jeweils mit nicht näher bestimmbar FAD/FMN-abhängigen Dehydrogenasen assoziiert, ein *etfAB*-Paar ist zusammen mit Acyl-CoA-Transferase und –Dehydrogenase im Genom lokalisiert. Ein weiteres liegt in einer Umgebung, deren Gene hohe Ähnlichkeit zu denen eines *fixABCX*-Komplexes haben. Dieser Enzymkomplex steht in *Rhodospirillum rubrum* in Zusammenhang mit Stickstofffixierung und kann Elektronen zwischen löslichen Dehydrogenasen und Ubiquinonen übertragen (Edgren & Nordlund, 2004).

Neben EtfAB wurden in anderen Organismen weitere Enzyme gefunden, die Energie via *electron bifurcation* konservieren. Eine NADH-abhängige Ferredoxin<sub>red</sub>:NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (NfnAB) in *C. kluyveri* koppelt die exergone Reduktion von NADP<sup>+</sup> mit Fd<sub>red</sub>

mit der endergonen Reduktion von  $\text{NADP}^+$  mit  $\text{NADH}$  in einer reversiblen Reaktion. Dieses Enzym könnte für *C. kluyveri* der einzige Weg zur Regeneration von  $\text{NADPH}$  aus  $\text{NADH}$  und  $\text{NADP}^+$  sein, da kein Gen für eine Transhydrogenase gefunden werden konnte (Wang *et al.*, 2010). Bei einem Vergleich der Proteinsequenzen von NfnAB mittels BLAST in *C. ljungdahlii* konnte ein Gen (CLJU\_c37240) gefunden werden, dessen N-Terminus hohe Ähnlichkeit mit NfnA und der C-Terminus mit NfnB aufweist. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein dieses Gens in *C. ljungdahlii* sein, wobei es scheint, dass die beiden Gene aus *C. kluyveri* miteinander verschmolzen sind.

Auch bei Hydrogenasen von *Thermotoga maritima* (Schut & Adams, 2009) und *A. woodii* (Schuchmann & Müller, 2012) konnte eine *electron bifurcation* nachgewiesen werden. Dabei werden bei der Spaltung von molekularem  $\text{H}_2$  sowohl Ferredoxin als auch  $\text{NAD}^+$  reduziert bzw. beide Cofaktoren oxidiert, wenn  $\text{H}_2$  wie bei *T. maritima* produziert wird. Auch in *C. ljungdahlii* kann eine Hydrogenase (CLJU\_c14700 – CLJU\_c14720) identifiziert werden, die Ähnlichkeiten im Aufbau der Untereinheiten und in der Sequenz zu der von *T. maritima* aufweist. Die endergone Reaktion der Elektronenübertragung von  $\text{H}_2$  auf Ferredoxin durch eine Ni-Fe-Hydrogenase ist bei dem hydrogenotrophen Archaeon *Methanothermobacter marburgiensis* mit der exergonen Reaktion der Heterodisulfid-Reduktase gekoppelt (Kaster *et al.*, 2011). Es wird spekuliert, dass in acetogenen Bakterien bei Wachstum auf  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  die stark exergone Reduktion von Methyl-THF zu Metylen-THF durch die Methyl-THF-Reduktase mit der Reduktion von Ferredoxin mit  $\text{H}_2$  durch den Mechanismus der *electron bifurcation* gekoppelt ist (Thauer, 2011). Dies muss jedoch noch bewiesen werden.

#### 4.2. Verifizierung des genetischen Potentials mittels Wachstumsversuchen und genomweiter Transkriptionsanalysen

Im Rahmen der Sequenzierung und Annotation des Genoms von *C. ljungdahlii* konnte ein Überblick über das genetische Potential der 4198 annotierten ORFs geschaffen werden. Darauf aufbauend wurde getestet, ob der Organismus auch auf den unterschiedlichen, vorhergesagten Substraten wachsen kann. Dabei stellte sich heraus, dass, obwohl ein Glycin-Dehydrogenase-Komplex im Genom kodiert ist, kein Wachstum auf Glycin zu beobachten war. Ebenso konnte kein Wachstum allein auf Betain gefunden werden, jedoch konnte *C. ljungdahlii* bei Zugabe von Betain und Ethanol wachsen (siehe 3.2.5). In einem weiteren Schritt wurden verschiedene Substrate und Wachstumsbedingungen ausgewählt, um die



Genregulation unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Dafür wurde ein DNA-Microarray erstellt, der 98,5% aller ORFs des Genoms von *C. ljungdahlii* abdeckt. Mit dieser Methode wurden genomweite Transkriptionsanalysen angefertigt, um ein möglichst umfassendes Bild der Genregulation in *C. ljungdahlii* bei Verwertung unterschiedlicher Substrate zu erhalten. Nachfolgend werden hauptsächlich die Expressionsunterschiede zu Fruktose bei drei verschiedenen Substraten behandelt. Von besonderer Bedeutung ist die Analyse der Genregulation bei Wachstum auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> bzw. Synthesegas, da es bisher keine Transkriptionsdaten zu autotrophen Wachstum bei acetogenen Bakterien gibt. In einem zweiten Punkt wird die Genexpression bei Wachstum auf Betain und Ethanol analysiert, bei der der Organismus eine Art Stickland-Reaktion ausführt. In einem dritten Punkt wird auf die großen Unterschiede in der Genexpression bei Wachstum auf Glukose im Vergleich zu Fruktose eingegangen.

#### 4.2.1. Autotrophes Wachstum

Acetogene Bakterien wie *C. ljungdahlii* können autotroph auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> und teilweise CO und auf Synthesegas (ca. 50-65% CO, 30-45% H<sub>2</sub>, 2-5% CO<sub>2</sub>) wachsen und stellen dabei Acetat und Ethanol in unterschiedlichen Verhältnissen her. Diese Fähigkeit ist wirtschaftlich interessant, da Synthesegas preiswert aus verschiedenen Quellen wie Erdgas, Rohöl oder auch Biomasse oder Hausmüll hergestellt werden kann. *C. ljungdahlii* kann trotz Schwefelverunreinigungen mit z. B. Carbonylsulfiden (COS) im Synthesegas CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als Substrate verwerten und zeigt robustes Wachstum (Smith *et al.*, 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass Ethanol während des gesamten Wachstumszyklus von *C. ljungdahlii* gebildet wird. Dies ist ein Unterschied zu anderen Lösungsmittelbildnern, wie *C. acetobutylicum* und auch *C. carboxidivorans*, mit einem biphasischen Wachstum, die die Lösungsmittel erst in der zweiten, der solventogenen Phase bilden (Datar *et al.*, 2004).

Bisher sind neben *C. ljungdahlii* mit *A. woodii* (Poehlein *et al.*, 2012) und *M. thermoacetica* (Pierce E., 2008) nur die Genome von drei homoacetogenen Organismen veröffentlicht.

Des Weiteren ist das autotrophe Wachstum von Homoacetogenen aus bioenergetischer Sicht von Interesse, da im Laufe des Wood-Ljungdahl-Wegs keine Netto-Synthese von ATP stattfindet (Ragsdale, 2004; Ragsdale & Pierce, 2008), so dass Energie über andere Wege generiert werden muss. Außerdem gibt es bei Wachstum von *C. ljungdahlii* auf verschiedenen Substraten Unterschiede in der Produktspezifität, da bei Wachstum auf Synthesegas Ethanol

und Acetat gebildet wird, bei Wachstum  $H_2/CO_2$  werden jedoch nur geringe Mengen an Ethanol und hauptsächlich Acetat gebildet (Cotter *et al.*, 2009b; Köpke, 2009b). Ein Ziel dieser Arbeit ist es, Gene zu identifizieren, die bei autotrophen Wachstum eine wichtige Rolle bei der  $CO_2$ -Fixierung und der Energiegewinnung innehaben können und Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden autotrophen Bedingungen im Vergleich zur Standardbedingung (siehe 3.2.3) zu identifizieren.

Schon beim Vergleich des Wachstumsverhaltens und der erreichten Zelldichte zeigen sich bei der Kultivierung von *C. ljungdahlii* auf Synthesegas und  $H_2/CO_2$  Unterschiede. Der Organismus erreichte bei gleichen Kultivierungsbedingungen mit Synthesegas als Substrat eine maximale  $OD_{600}$  von fast 1 und somit eine 2-3mal so hohe Zelldichte wie bei Wachstum auf  $H_2/CO_2$  (Köpke, 2009b). Dies lässt den Schluss zu, dass *C. ljungdahlii* CO als Elektronenakzeptor gegenüber  $CO_2$  vorzieht. Auch in einer anderen Arbeit wurde diese Beobachtung gemacht, dass bei gleichem Anteil von CO und  $CO_2$ , CO bevorzugt verbraucht wurde (Cotter *et al.*, 2009b). Einen alternativen terminalen Elektronenakzeptor stellt Nitrat dar. Obwohl bei heterotrophen Wachstum kein Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden kann, zeigt der Organismus mit Nitrat autotroph auf  $H_2/CO_2$  besseres Wachstum mit höheren Zelldichten als bei Kultivierung mit  $H_2/CO_2$  alleine. Dies lässt die Vermutung zu, dass Nitrat sowohl als Stickstoffquelle als auch als Elektronenakzeptor genutzt werden kann. Auch *M. thermoacetica* und *M. thermoautotrophica* können Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor nutzen. Dieses wird über Nitrit zu Ammonium reduziert. Dies geht bei diesen beiden Organismen einher mit einer Verringerung der Acetatbildung (Fröstl *et al.*, 1996; Seifritz *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass auch bei *C. ljungdahlii*  $CO_2$  nicht der bevorzugte terminale Elektronenakzeptor ist. Die Acetatbildung wurde bei Wachstum auf  $H_2/CO_2$  mit Nitrat im Rahmen dieser Arbeit nicht gemessen.

Im Folgenden wird die Genexpression von Zellen, gewachsen mit  $H_2/CO_2$  bzw. Synthesegas als Substrat in Verhältnis zu auf Fruktose gewachsenen Zellen betrachtet. Dabei wird vor allem auf Expressionsunterschiede bei Genen des autotrophen Stoffwechsels und der Bildung von Ethanol geachtet, da *C. ljungdahlii* bei Wachstum auf Synthesegas der, neben Acetat, gebildete Anteil an Ethanol zunimmt.

CO kann von *C. ljungdahlii* nicht nur als C-Quelle sondern auch als Energiequelle genutzt werden, so dass CO gegenüber  $CO_2$  bevorzugt verwertet wird. Bei der Oxidation von CO zu  $CO_2$  durch die CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase wird gleichzeitig Ferredoxin reduziert. Das wiederum kann bei seiner Regenerierung am Rnf-Komplex die Generierung eines

Protonengradienten betreiben und gleichzeitig  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduzieren. Das entstandene  $\text{CO}_2$  wird zu einem kleinen Teil gebunden und in Zellkohlenstoff umgewandelt werden, der größere Teil diffundiert jedoch aus der Zelle in das umgebende Medium. Dies bestätigen auch Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die festgestellt hat, dass bei Wachstum auf CO dieses verbraucht wird und mit der Zeit ein Anstieg der  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Gasphase festgestellt werden kann (Cotter *et al.*, 2009b).

*C. ljungdahlii* kann CO mit Hilfe zweier verschiedener Enzymkomplexe zu  $\text{CO}_2$  oxidieren: Ein System ist die aus drei Untereinheiten bestehende anaerobe CO-Dehydrogenase, das andere die bifunktionelle CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase. In diesem System wird die reversible Reaktion von CO zu  $\text{CO}_2$  von der AcsA-Untereinheit katalysiert (Ragsdale & Kumar, 1996; Seravalli *et al.*, 1997). In den Transkriptionsanalysen von auf Synthesegas gewachsenen Zellen konnte eine Repression der anaeroben CO-Dehydrogenase gegenüber der Standardbedingung festgestellt werden. Die Gene der CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase zeigten in der Genexpression keinen Unterschied zu der von auf Fruktose gewachsenen Zellen. Obwohl beide Systeme CO oxidieren, wird die Genexpression eines Systems anscheinend reprimiert. Eine mögliche Erklärung liefert ein genauerer Blick auf die verwendeten Reduktionsäquivalente. Bei der CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase wird bei der Oxidation von CO Ferredoxin reduziert (Bender & Ragsdale, 2010; Menon & Ragsdale, 1996; Seravalli *et al.*, 1997). Die zweite CO-Dehydrogenase besitzt neben der katalytischen Untereinheit zwei weitere Untereinheiten, die Ähnlichkeit zur  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit einer Phenylglyoxylat: $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase aus *Azoarcus evansii* besitzen, die wahrscheinlich den Elektronentransfer auf  $\text{NAD}^+$  katalysieren (Hirsch *et al.*, 1998). Diese Reaktion ist für *C. ljungdahlii* energetisch ungünstiger, da hierbei kein Protonengradient aufgebaut werden kann. Mit Hilfe des reduzierten Ferredoxins aus der Reaktion der CO-Dehydrogenase/Acetat-Synthase kann der Rnf-Komplex durch die Übertragung der Elektronen von Ferredoxin auf  $\text{NAD}^+$  einen Protonengradienten aufbauen. Da bei autotrophem Wachstum die Energiekonservierung fast ausschließlich durch den Aufbau eines chemiosmotischen Membranpotentials gewährleistet wird, wird der energetisch günstigere Prozess zur CO-Oxidation vermutlich bevorzugt und der ungünstigere schon auf Transkriptionsebene reprimiert.

Durch die Oxidation wird der Redox-Zustand der Zelle stark reduziert, da viele Reduktionsäquivalente in einem reduzierten Zustand vorliegen. Diese können bei der Bildung von Ethanol reoxidiert werden. Im Genom von *C. ljungdahlii* konnten verschiedene Gene

identifiziert werden, die für diese Reaktionen in Frage kommen. Setzt man diese Funde in Vergleich mit in Clostridien bekannten Prozessen ergeben sich folgende interessante Punkte. In *C. acetobutylicum* konnte als verantwortliches Enzym eine bifunktionale Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase (AdhE) (Dürre *et al.*, 1995; Fontaine *et al.*, 2002) identifiziert werden. Man findet zwei Genkopien im Genom, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Acetogenese und Solventogenese induziert sind (Grimmler *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2010; Nolling *et al.*, 2001). Bei *C. carboxidivorans*, der ebenfalls einen biphasischen Stoffwechsel zu besitzen scheint und Ethanol und Butanol aus Synthesegas herstellen kann (Datar *et al.*, 2004), wurde gezeigt, dass zwei *adhE*-Gene in der solventogenen Phase verstärkt exprimiert werden (Ukpong *et al.*, 2012).

Auch in *C. ljungdahlii* findet man zwei im Genom aufeinanderfolgende Kopien einer bifunktionalen *adhE*, jedoch zeigte sich in den genomweiten Transkriptionsanalysen, dass für die Reaktionen von Acetyl-CoA via Acetaldehyd zu Ethanol getrennte Enzyme verantwortlich sind. Bei Bildung von Ethanol wird die Transkription von einer NAD(P)H-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase, zwei Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktasen und einer Aldehyd-Oxidoreduktase mit Ähnlichkeiten zu Xanthin-Dehydrogenasen induziert. Dabei wird einerseits Ferredoxin durch die Reduktion von Acetaldehyd und andererseits NADH durch die Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol regeneriert. Der vergleichsweise reduzierte Zustand der Zellen könnte auch eine Erklärung für die reprimierte Expression der NAD<sup>+</sup>-abhängigen CO-Dehydrogenase sein.

Im Gegensatz dazu wird bei Wachstum auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> kein zusätzliches Ferredoxin reduziert, das für den Aufbau eines Protonengradienten und somit zur ATP-Synthese genutzt werden könnte. Dies könnte auch ein Grund für das langsamere Wachstum zu niedrigeren Zelldichten von *C. ljungdahlii* auf diesem Substrat sein. In Transkriptionsanalysen zeigte sich, dass bei Wachstum auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> eine Formiat-Dehydrogenase zur Bindung von CO<sub>2</sub> und Bildung von Formiat hochreguliert ist im Vergleich zu Wachstum auf Fruktose. Dies macht Sinn, da CO<sub>2</sub> als gasförmiges Substrat über die Zellmembran in, aber auch wieder aus der Zelle heraus diffundieren kann. Bei der Reduktion zu Formiat, einer Säure, wird es in der Zelle gebunden, da geladene Ionen fast ausschließlich mit Hilfe von Transportern und dem damit verbundenen Energieverbrauch über die Membran gelangen. Keine Expressionsänderung konnte bei den restlichen Genen des Wood-Ljungdahl-Wegs festgestellt werden. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass auch bei heterotrophem Wachstum auf Fruktose CO<sub>2</sub> bei der Reaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase entsteht, das durch

den Wood-Ljungdahl-Weg zu Acetat oxidiert wird. Durch die Möglichkeit, während der Glykolyse Reduktionsäquivalente und ATP durch Substratkettenphosphorylierung zu generieren, ist *C. ljungdahlii* bei heterotrophem Wachstum weniger stark auf CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle angewiesen.

Ein weiteres wichtiges Enzym für das Wachstum auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> ist die Hydrogenase. Diese katalysiert die reversible Spaltung von molekularem Wasserstoff zu zwei [H]<sup>+</sup> und zwei Elektronen die auf Cofaktoren übertragen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass tatsächlich nur zwei der vier Hydrogenasen ein Fluoreszenzsignal liefern. Die Signale auf dem DNA-Microarray der anderen beiden Hydrogenasen waren so schwach, dass sie nicht vom Hintergrund unterschieden werden konnten, also vermutlich nicht exprimiert werden. Bei den Genen CLJU\_c17270/80 konnte bei beiden autotrophen Substraten keine Regulation der Genaktivität gegenüber Kulturen, die auf Fruktose angezogen wurden, festgestellt werden. Im Gegensatz dazu waren die Gene CLJU\_c07070/80 nur bei Wachstum auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> induziert. Diese Ferredoxin-abhängige Hydrogenase ist mit Homologen von *nuoEFG* assoziiert, die den löslichen Teil der NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I der Atmungskette in *E. coli*) bilden und an denen die Reduktion von NAD<sup>+</sup> stattfindet (Friedrich & Scheide, 2000). Wenn die CLJU\_c07070/80 mit den Homologen von NuoEFG einen Enzymkomplex bilden, könnte das Vorhandensein von Ferredoxin- und NAD<sup>+</sup>-Bindestellen ein Hinweis auf das Vorhandensein eines möglichen *electron bifurcation* Mechanismus zur Energiegewinnung sein. Ob die Untereinheiten der Hydrogenase mit den Homologen von NuoEFG einen Enzymkomplex bilden und der Reaktionsmechanismus *electron bifurcation* einschließt, müsste jedoch noch biochemisch untersucht werden. Es konnte aber in anderen Organismen wie *T. maritima* oder *A. woodii* schon gezeigt werden, dass Hydrogenasen *electron bifurcation* zur gekoppelten Reduktion von Ferredoxin und NAD<sup>+</sup> nutzen (Schuchmann & Müller, 2012; Schut & Adams, 2009).

*Electron bifurcation* wurde auch bei Enzymen, die mit EtfAB-Proteinen assoziiert sind, bewiesen. Die bei *C. ljungdahlii* vorhandenen *etfAB*-Gene zeigen in Transkriptionsanalysen keine erhöhte Expression gegenüber heterotrophem Wachstum auf Fruktose. Dies lässt den Schluss zu, dass EtfAB-assoziierte Dehydrogenasen bei autotrophem Wachstum keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle in *C. ljungdahlii* spielen.

### 4.2.2. Wachstum auf verschiedenen heterotrophen Substraten als C-Quelle

Neben dem autotrophen Wachstum wurde zusätzlich das Wachstum von *C. ljungdahlii* auf verschiedenen Zuckern und Gluconsäure als Fruchtsäure untersucht. Dabei erreichte der Organismus allgemein eine höhere Wachstumsrate und OD<sub>600</sub>. Mit Fruktose, den Pentosen und Gluconat als C-Quellen konnte *C. ljungdahlii* innerhalb von 2-3 Tagen zu Zelldichten von OD<sub>600</sub> gleich 1,5 – 2,5 wachsen. Auch hier sind die Hauptprodukte Acetat und Ethanol. Unterschiede im Wachstumsverhalten gibt es mit Glukose als C-Quelle. Hier zeigt *C. ljungdahlii* nach einer Adaptionzeit von 2-6 Wochen langsames Wachstum mit einer geringeren maximalen Zelldichte im Vergleich zu Fruktose.

Im Folgenden wird die Genexpression von Zellen, gewachsen mit unterschiedlichen Zuckern als Substrat, im Verhältnis zu auf Fruktose gewachsenen Zellen betrachtet. Außerdem werden anhand sämtlicher DNA-Microarray-Experimente, die Gene identifiziert, die bei Wachstum auf Fruktose hochreguliert sind.

#### **Fruktose**

Die Genexpression von auf Fruktose gewachsenen Kulturen wurde im Rahmen dieser Arbeit als Standardbedingung genutzt. Bei einem Abgleich sämtlicher DNA-Microarray-Experimente konnten einige markante Gene und Gencluster identifiziert werden, die bei Wachstum auf Fruktose bei allen Experimenten induziert waren. Dazu gehört die erhöhte Expression eines der beiden Fruktose-spezifischen PTS-Systeme (CLJU\_c20590, siehe Tab. 46). Das zweite scheint inaktiv zu sein, da dieses in keinem der Experimente ein Signal gezeigt hat, so dass man davon ausgehen kann, dass *C. ljungdahlii* das aktive PTS-System als Haupttransporter für Fruktose nutzt. Anschließend wird Fruktose über die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. Dieses wird durch eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (CLJU\_c09340) zu CO<sub>2</sub> und Acetyl-CoA, woraus Acetat entsteht. CO<sub>2</sub> kann wiederum über den Wood-Ljungdahl-Weg zu einem dritten Acetat konvertiert werden. Die Gene der Glykolyse sind bei Wachstum auf Fruktose im Vergleich zu autotrophem Wachstum hochreguliert und die Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs im Vergleich zu Wachstum auf Betain und Ethanol. In beiden Fällen werden diese Stoffwechselwege bei Verwertung der jeweils anderen Substrate nicht oder nur in sehr geringem Umfang benötigt.

Auffällig war jedoch, dass die Gene zur Verwertung von Gluconat im Vergleich zum Wachstum auf Fruktose bei allen anderen untersuchten Substraten (Synthesegas, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, D-Glukose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Gluconat und Betain/Ethanol) hochreguliert waren. Dies kann auf eine von Fruktose induzierte Katabolitrepression hindeuten, so dass diese Gene bei Anwesenheit von Fruktose nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden. Eine Ausnahme bildet hier das Wachstum auf Xylose, bei dem nur ein Teil der Gene zur Gluconatverwertung hochreguliert sind (siehe Tab. 46).

## Diskussion

Tab. 46: **Transkriptionsänderungen der Gene ausgewählter heterotropher Stoffwechselwege bei Verwertung verschiedener Substrate im Vergleich zu Wachstum auf Fruktose** (↑ - Expressionserhöhung um  $\log_2 \geq 1$ ; ↓ - Expressionsänderung um  $\log_2 \leq -1$ ; ↔ - keine auffällige Expressionsänderung; n. b. - nicht bestimmt)

ID	Gen	Funktion/Annotation	log-Expressionsverhältnis					
			Syngas/ Frc	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> /Frc	Glc/Frc	Xyl/Frc	Gluconat/ Frc	Betain+EtO H/Frc
<b>Gene der Glykolyse</b>								
	CLJU_c20810	Transkriptionsregulator/ Glucokinase	↔	n.b.	↑	↔	↑	n.b.
<i>pgi</i>	CLJU_c37130	Glukose-6-Phosphatisomerase	n.b.	↔	↔	↔	↔	↔
<i>pfk</i>	CLJU_c03250	6-Phosphofruktokinase	↓	↓	↓	↔	↔	↓
<i>pyk</i>	CLJU_c03260	Pyruvat-Kinase	↓	↓	↓	↔	↔	↓
<i>eno</i>	CLJU_c39110	Enolase	↓	↓	↓	↔	↔	↓
<i>pgm</i>	CLJU_c39120	2,3-Bisphosphoglycerat- unabhängige Phosphoglycerat- Mutase	↓	↓	↓	↔	↔	↓
<i>tim</i>	CLJU_c39130	Triosephosphatisomerase	↓	↓	↓	↔	↔	↓
<i>pgk</i>	CLJU_c39140	Phosphoglyceratkinase	↓	↓	↓	↔	↔	↓
<i>gap</i>	CLJU_c39150	Glyceraldehyde-3-phosphat- Dehydrogenase	↓	↓	↓	↔	↔	↓
	CLJU_c39160	möglicher Transkriptionsregulator	↓	↓	↓	↔	↔	↓
<i>fba</i>	CLJU_c02810	Fruktose-Bisphosphat-Aldolase	↔	↔	↔	↔	↔	↔
<i>gap</i>	CLJU_c13400	Glyceraldehyde-3-Phosphat- Dehydrogenase	↓	↔	↔	↓	↓	↔
<i>fbp</i>	CLJU_c29050	Fruktose-1,6-Bisphosphatase	↓	↔	↓	↓	↓	↔
<b>PTS-System</b>								
	CLJU_c40530	Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase	↔	↔	↔	↔	↔	↔
<i>HPr</i>	CLJU_c21910	HPr Kinase/Phosphorylase	↔	↔	↔	↔	↔	↔
	CLJU_c20590	Fruktose-spezifisches PTS System, IIBC Komponente	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<i>fruB</i>	CLJU_c20600	1-Phosphofruktokinase	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	CLJU_c20610	Transkriptionsregulator, DeoR Familie	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>Gene der Gluconatverwertung</b>								
	CLJU_c11560	Zink-haltige Alkohol- Dehydrogenase	↔	↑	↑	↔	↑	↑
	CLJU_c11570	Xylulosekinase	↑	↑	↑	↔	↑	↑
	CLJU_c11580	D-3-phosphoglycerat- Dehydrogenase	↑	↑	↑	↔	↑	↑
	CLJU_c11590	6-Phosphogluconat- Dehydrogenase	↑	↑	↑	↔	↑	↑
<i>gntP</i>	CLJU_c11600	Gluconat/H <sup>+</sup> -Symporter	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<i>gntK</i>	CLJU_c11610	Gluconokinase	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	CLJU_c11620	mögliche D-isomer-spezifische 2-Hydroxyacid-Dehydrogenase	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	CLJU_c11630	2-Keto-3-Deoxy-6- Phosphogluconat-Aldolase	↑	↑	↑	↑	↑	↑



## Glukose

Der Vergleich der genomweiten Genexpression von auf Glukose gewachsenen Zellen zu auf Fruktose gewachsenen Zellen war insofern interessant, da es einige Unterschiede im Wachstumsverhalten und in den Produkten auf diesen beiden Substraten gibt, obwohl beide Substrate Hexosen sind und im Lauf der Glykolyse ineinander umgewandelt werden. Bemerkenswert ist auch, dass *C. ljungdahlii* nach Wachstum in einem anderen Substrat eine Adaptionszeit von 2-6 Wochen benötigt, um auf Glukose wachsen zu können. Des Weiteren ist die Wachstumsrate niedriger als bei Kultivierung des Organismus auf Fruktose. Zusätzlich produziert *C. ljungdahlii* bei Wachstum auf Glukose schätzungsweise 0,5 - 1 mM Glykolat, das mittels GC/MS nachgewiesen wurde. Im Vergleich dazu werden während des Wachstums ca. 60 mM Acetat hergestellt.

Schon in der Genomannotation konnte ein möglicher Grund für das langsamere Wachstum auf Glukose entdeckt werden. Im Genom findet sich nur ein PTS-System, das für den Transport von Fruktose spezifisch ist, jedoch keines für Glukose. Bei genomweiten Transkriptionsanalysen offenbarte sich, dass es große Unterschiede in der Genregulation bei diesen beiden Substraten gibt. Dabei sind v. a. zwei Pyruvat:Formiat-Lyasen und ein Cluster mit Genen zur Carboxysombildung besonders interessant, deren Gene nur bei der Verwertung von Glukose stark induziert sind. Dieses Gencluster besteht u. a. aus Genen für eine Alkohol-Dehydrogenase, Aldehyd-Dehydrogenase und einigen Genen, die für Shellproteine zur Bildung eines Mikrokompartiments bzw. Carboxysoms kodieren (Genorganisation siehe Abb. 35). Manche dieser Gene haben Ähnlichkeit zu Genen zur Ethanolamin- bzw. 1,2-Propandiolverwertung von *S. typhimurium* (Kofoid *et al.*, 1999; Walter *et al.*, 1997).

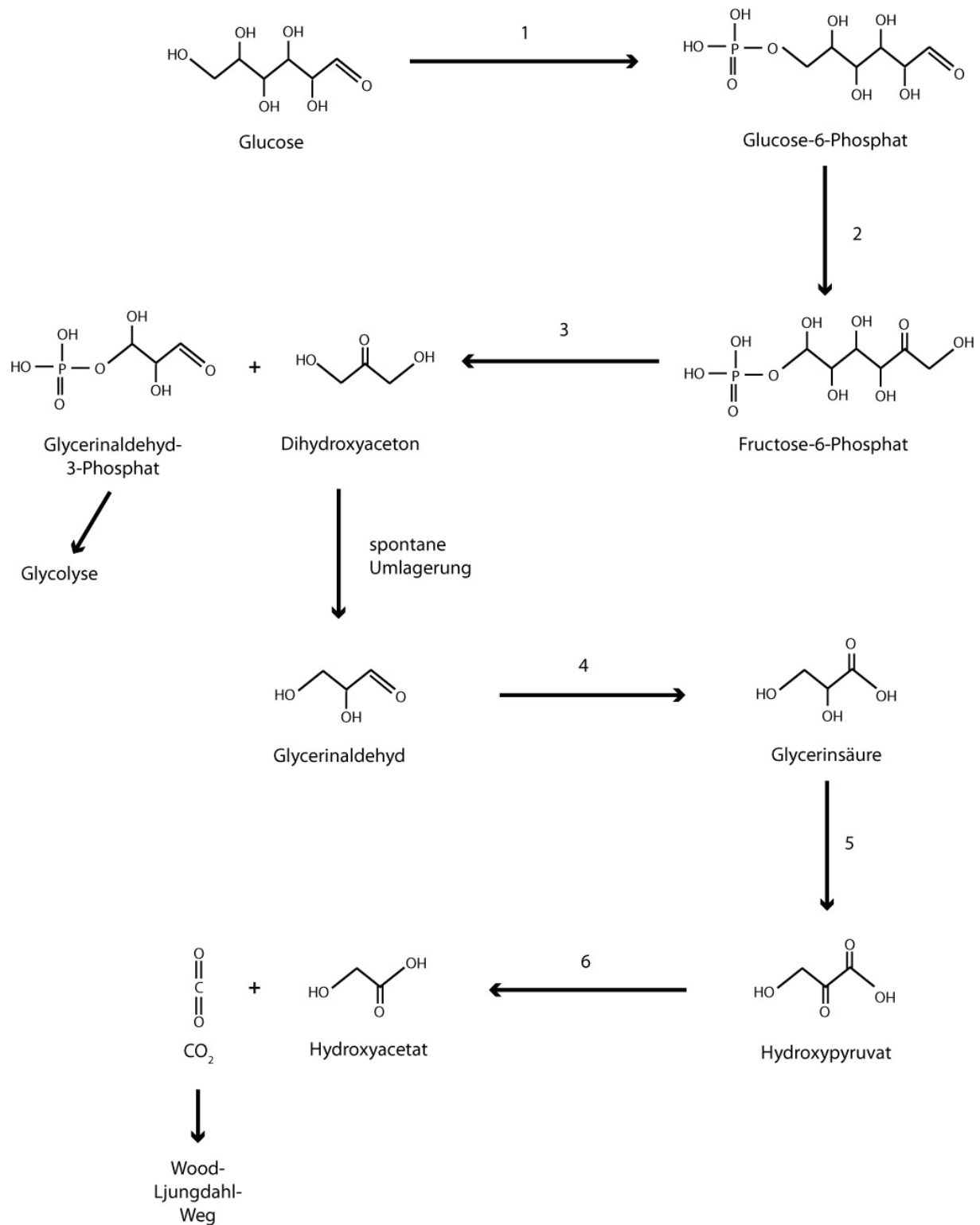
Da nur bei der Verwertung von Glukose dieses Gencluster hochreguliert ist und gleichzeitig Glykolat als Produkt auftritt, kann dies als Hinweis darauf interpretiert werden, dass diese Gene durch die Anwesenheit von Glukose induziert werden und in die Produktion dieses Stoffes involviert sein könnten. Nachfolgend ist eine Hypothese zur Produktion von Glykolat beschrieben (siehe auch Abb. 50). Diese wurde aufgrund der auffällig hochregulierten Gene und dem Auftreten von Hydroxypyruvat als Endprodukt aufgestellt und es bedarf weiterer Experimente, diese Hypothese zu beweisen oder zu widerlegen. Die hier vorgestellte Hypothese könnte ein alternativer Stoffwechselweg sein, der in Konkurrenz zur Glykolyse steht und dessen Gene nur in Anwesenheit von Glukose induziert werden. Ansonsten werden die Gene anscheinend strikt reprimiert.

Glukose kann in der Zelle mittels einer Glukosekinase (CLJU\_c20810) zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert und anschließend durch eine Glukose-6-Phosphat-Isomerase (CLJU\_c37130) zu Fruktose-6-Phosphat umgewandelt werden. Diese beiden Reaktionen sind Teil der Glykolyse. Auch die Expression der Glukosekinase wird durch die Anwesenheit von Glukose stark gesteigert. Fruktose-6-Phosphat kann weiter in der Glykolyse verwertet werden oder durch die Fruktose-6-Phosphat-Aldolase (CLJU\_c25960) in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton gespalten werden. Die Reaktion dieses Enzyms ist reversibel, jedoch ist das Reaktionsgleichgewicht zugunsten von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton verschoben, da Glycerinaldehyd-3-Phosphat in die Glykolyse bzw. in den Pentose-Phosphat-Weg eingeschleust werden kann. Bei Dihydroxyaceton ist dies aufgrund der fehlenden Phosphatgruppe jedoch nicht möglich. Dieses Molekül kann durch eine Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung (eine Aldose-Ketose-Isomerisierung) in Glycerinaldehyd konvertiert werden und befindet sich somit in einem chemischen Gleichgewicht mit Glycerinaldehyd. Da diese Umlagerung nicht enzymatisch katalysiert ist und somit langsamer verläuft, wäre es von Vorteil, wenn sie in einem Carboxysom ablaufen würde. Der Vorteil hierbei wäre, dass in diesem subzellularen Kompartiment veränderte physiologische Bedingungen herrschen können, die diese Reaktion begünstigen. Anschließend könnte Glycerinaldehyd durch eine Aldehyd-Dehydrogenase (CLJU\_c11960) zu Glycerinsäure umgewandelt werden. Somit würde das Gleichgewicht der Umlagerung in Richtung Glycerinaldehyd verschoben, da dies durch die nachfolgende Reaktion dem Gleichgewicht entzogen würde. Auch diese Reaktion könnte in dem Carboxysom lokalisiert sein, da durch die höhere Konzentration des Edukts die Effizienz der Reaktion erhöht wäre (Yeates *et al.*, 2008).

Die Phosphoderivate von Glycerat spielen ebenfalls, wie die von Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd eine wichtige Rolle in verschiedenen Stoffwechselwegen, z. B. der Glycolyse. Die OH-Gruppe am C2-Atom des Glycerats könnte durch eine Glycerat-Dehydrogenase zu einer Keto-Gruppe oxidiert werden, so dass Hydroxypyruvat entsteht. Ein Enzym, das dafür in Frage kommen könnte, ist eine 2-Hydroxysäure-Dehydrogenase. Im Genom findet man mehrere 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen (CLJU\_c00670/80, CLJU\_c11620), für die die Substratspezifität nicht näher bestimmt werden konnte.

Das entstandene Hydroxypyruvat könnte wiederum als Substrat für ein Glycyl-Radikal-Enzym (CLJU\_c25970/80 bzw. CLJU\_c11830/40) dienen. Diese Sauerstoff-sensitiven Enzyme besitzen ein Glycin im aktiven Zentrum, das zu einem Glycyl-Radikal aktiviert wird.

Zur Erzeugung dieses Radikals wird ein S-Adenosylmethionin-abhängiges, aktivierendes Enzym benötigt (Selmer *et al.*, 2005). Beispiele für Glycyl-Radikal-Enzyme sind die Pyruvat:Formiat-Lyase, eine Benzylsuccinat-Synthase aus *Thauera aromatica* (Achong *et al.*, 2001; Qiao & Marsh, 2005) oder eine Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase von *C. difficile* und *Clostridium scatologenes* (Yu *et al.*, 2006). Bei einem Sequenzvergleich der Glycyl-Radikal-Enzyme von *C. ljungdahlii* (CLJU\_c11830/40, CLJU\_c25970/80) mit Sequenzen der SWISS-Prot-Datenbank, konnten sowohl Ähnlichkeiten mit einer Pyruvat:Formiat-Lyase als auch mit einer Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase festgestellt werden. Beide Enzymkomplexe spalten unter Radikalbildung Formiat bzw. CO<sub>2</sub> ab. Eines oder beide Glycyl-Radikal-Enzyme könnten in diesem Fall Hydroxypyruvat als Substrat nutzen und die Spaltung zu Glykolat und CO<sub>2</sub> katalysieren. CO<sub>2</sub> könnte in den Wood-Ljungdahl-Weg eingeschleust werden, wohingegen Glykolat aus der Zelle ausgeschleust wird.



**Abb. 50: Hypothetisches Reaktionsschema zur Bildung von Glykolat aus Glukose.** 1: Glucosekinase (CLJU\_c20810); 2: Glukose-6-Phosphat-Isomerase (CLJU\_c37130); 3: Fruktose-6-Phosphat Aldolase (CLJU\_c25960); 4: Aldehyd-Dehydrogenase (CLJU\_c11960); 5: D-spezifische 2-Hydroxysäure-Dehydrogenase (evtl. CLJU\_c00670/80); 6: Glycyl-Radikal Enzym (CLJU\_c25970/80 bzw. CLJU\_c11830/40)

Die Konzentration von Glykolat konnte leider nicht genau bestimmt werden, da bei dem verwendeten IC-System die Elution von Acetat und Glykolat zu nah aufeinander folgt, so dass

die Peaks nicht unterscheidbar sind. Auch verschiedene Elutionsprotokolle brachten keinen Erfolg. Weitere Produkte konnten weder mit Ionenchromatographie noch mit GC/MS bestimmt werden, was jedoch wenig Aussagekraft hat, da die Konzentration dieser Stoffe eventuell unter der Nachweisgrenze der Systeme lagen.

### **Pentosen und Gluconat**

Während des Wachstums auf den Pentosen Xylose bzw. Arabinose konnte eine starke Induktion der Gene der entsprechenden Operone beobachtet werden und auch die Spezifität der Gene verifiziert werden. Das jeweils entstehende Xylulose-5-Phosphat kann anschließend in den Pentose-Phosphat-Weg eingeschleust werden. Die Gene dieses Stoffwechselwegs werden konstitutiv exprimiert, wobei jeweils nur eine der zwei Kopien von *tal* und *tka* ein Signal in den DNA-Microarrays besitzen. Das Finden dieser konstitutiven Expression dieser beiden Gene ist nicht weiter verwunderlich, da der Pentose-Phosphat-Weg nicht nur zum Abbau von Pentosen verwendet wird und Zwischenprodukte in den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg eingeschleust werden können, sondern auch zur Synthese von Pentosen oder Tetrosen für u. a. die Nukleotidbiosynthese genutzt wird. Auffällig ist, dass die Genexpression der Fruktose-1,6-Bisphosphatase und die der alleinstehenden, zweiten Kopie der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (CLJU\_c13400) bei Wachstum auf Pentosen reprimiert ist. Die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (CLJU\_c29050) ist ein Enzym der Gluconeogenese und ist für die Synthese von Fruktose-6-Phosphat zuständig. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert die reversible Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat, wobei diese zweite Kopie (CLJU\_c13400) vermutlich während der Gluconeogenese transkribiert wird und somit das Reaktionsgleichgewicht in Richtung Glycerinaldehyd-3-Phosphat verschoben ist. Die Präsenz von zwei Genen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die die entgegengesetzte Richtung einer Reaktion katalysieren, wurde schon in photosynthetischen Bakterien (Koksharova *et al.*, 1998) oder auch *Bacillus subtilis* beschrieben (Fillinger *et al.*, 2000). Sowohl Fruktose-6-Phosphat als auch Glycerinaldehyd-3-Phosphat sind Zwischenprodukte in der Glycolyse und im Pentose-Phosphat-Weg. Hier könnte das Produktgleichgewicht durch die Expression dieser Gene reguliert und zugunsten des Abbaus bzw. der Synthese von Pentosen verschoben werden. Bei Wachstum auf Fruktose, wenn Pentosen neu synthetisiert werden müssen, sind diese Gene induziert, so dass genügend Substrat in Form von Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat zur Synthese von u. a. D-Ribose zur Verfügung

steht. Bei Wachstum auf Pentosen werden diese Zwischenprodukte in den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg eingeschleust und zu Pyruvat konvertiert. Dadurch werden Zwischenprodukte entfernt und der Pentose-Phosphat-Weg wird zum Abbau von Pentosen genutzt. Somit könnte man spekulieren, dass über die Genexpression dieser beiden Gene – Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (CLJU\_c13400) und Fruktose-1,6-Bisphosphatase (CLJU\_c29050) - der Pentose-Phosphat-Weg in Richtung Abbau bzw. Synthese von Pentosen gesteuert wird.

Gluconat wird zu 6-Phospho-D-Gluconat phosphoryliert und anschließend von der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in D-Ribulose-5-Phosphat und CO<sub>2</sub> gespalten. CO<sub>2</sub> kann über den Wood-Ljungdahl-Weg zu Acetyl-Co-A reduziert werden, und D-Ribulose-5-Phosphat wird in den Pentose-Phosphat-Weg eingeschleust. In den Transkriptionsanalysen konnte man beobachten, dass dabei hauptsächlich die Gene, die für den Gluconatabbau verantwortlich sind, stark induziert waren. Die Gene des Pentose-Phosphat-Wegs scheinen nicht reguliert zu sein und es konnte kein Unterschied zur Standardbedingung beobachtet werden. Wie beim Abbau von Pentosen, konnte auch bei diesen Experimenten die verringerte Expression der Fruktose-1,6-Bisphosphatase und der alleinstehenden Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (CLJU\_c13400) beobachtet werden.

### 4.2.3. Wachstum auf Betain und Ethanol – eine Stickland-analoge Reaktion

Obwohl im Genom von *C. ljungdahlii* zwei Betainreduktasen identifiziert werden konnten, konnte kein Wachstum auf diesem Substrat allein festgestellt werden. Da Betain schon als Bestandteil von Stickland-Reaktionen bekannt war (Fendrich *et al.*, 1990; Heijthuijsen & Hansen, 1989; Möller *et al.*, 1986), wurden verschiedene Cosubstrate getestet. Von diesen konnte der Organismus nur mit der Substratkombination Betain und Ethanol wachsen, wobei er auf beiden einzeln kein Wachstum gezeigt hat. Daraus lässt sich schließen, dass *C. ljungdahlii* diese beiden Substrate gleichzeitig in einer Art Stickland-Reaktion verwertet. Durch Messungen der Substrat- und Produktkonzentrationen konnte bestätigt werden, dass beide Substrate gleichzeitig verwertet werden.

Sticklandreaktionen sind dadurch charakterisiert, dass eine Aminosäure reduziert und eine andere oxidiert wird, bei gleichzeitiger Deaminierung. Die beiden Komponenten werden dabei gleichzeitig verstoffwechselt und die bei der Oxidation einer Aminosäure entstandenen Reduktionsäquivalente bei der Reduktion der anderen Aminosäure regeneriert. In der

Literatur findet man bisher nur Paare aus proteinogenen Aminosäuren sowie Aminosäurederivaten wie Sarcosin und Betain beschrieben. *C. ljungdahlii* kann jedoch eine ungewöhnliche Kombination bestehend aus Betain, einer tertiären Aminosäure zusammen mit einem Alkohol in einer Stickland-analogen Reaktion verstoffwechseln. Dass Ethanol oder Glukose als unspezifische Elektronendonatoren dienen können, wurde bereits früher in Zell-Rohextrakten mit DPN als künstlichen Elektronenakzeptor nachgewiesen. Allerdings wurde dies bisher nie in lebenden Kulturen beobachtet (Nisman, 1954; Stickland, 1934).

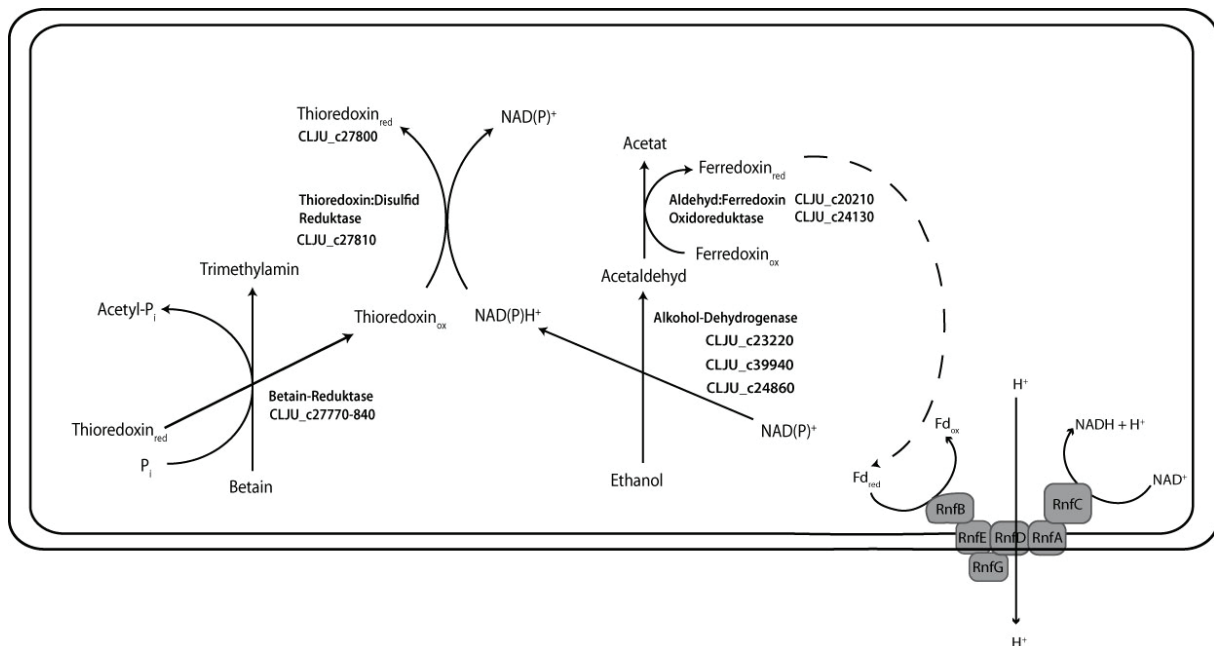
Durch die Abspaltung einer Methylgruppe wird Betain zu Trimethylamin reduziert und Thioredoxin oxidiert. Gleichzeitig wird Ethanol über Acetaldehyd zu Acetat oxidiert und  $\text{NAD(P)}^+$  reduziert. Das oxidierte Thioredoxin und das reduzierte  $\text{NAD(P)}\text{H}^+$  werden durch eine Thioredoxinreduktase wieder regeneriert.

Mit Hilfe von Transkriptionsanalysen wurden die Gene identifiziert, die bei Wachstum mit Betain und Ethanol hochreguliert sind, im Vergleich zum Wachstum auf Fruktose. Dabei stellte sich heraus, dass nur eines der beiden Gencluster für Betainreduktasen hochreguliert ist. Das zweite Gencluster ist in der Genreihenfolge identisch aufgebaut und auch die Sequenz zeigt eine starke Ähnlichkeit zu dem aktiv abgelesenen Cluster, die Gene werden jedoch nicht exprimiert. Dieses Cluster für eine mögliche Betainreduktase könnte somit eine andere Spezifität besitzen oder aber die regulatorische Region *upstream* ist durch Mutationen oder Deletionen so stark beschädigt, dass diese nicht mehr funktionsfähig ist. In der Nachbarschaft der exprimierten Betainreduktase liegt ein Set von Genen, welches mit der Selenocysteinbiosynthese assoziiert ist. Auch diese Gene sind bei Wachstum mit Betain und Ethanol stark induziert. Dies deutet auf eine gemeinsame Regulation der Gene mit denen der Betainreduktase hin. Ein zweites Set von Genen für die Selenocysteinbiosynthese ist zusätzlich im Genom vorhanden und zeigt unter allen untersuchten Wachstumsbedingungen ein schwaches Signal. Daraus lässt sich schließen, dass ein Operon konstitutiv exprimiert wird und dies die basale Menge an Selenocysteinproduktion abdeckt. Da zwei Untereinheiten der Betainreduktase Selenocystein enthalten, scheint es, dass zur schnellen Synthese der Betainreduktase zusätzliches Selenocystein bereitgestellt werden muss. Sowohl die Betainreduktase als auch die Gene für die Selenocysteinbiosynthese werden sehr wahrscheinlich durch die Anwesenheit von Betain induziert, da auch bei Transkriptionsanalysen von Kulturen, gewachsen mit Betain und Fruktose, diese Gene hochreguliert waren.

Die Oxidation von Ethanol via Acetaldehyd zu Acetat erfolgt in zwei Reaktionen: Ethanol wird durch eine Alkohol-Dehydrogenase zu Acetaldehyd umgesetzt. Dabei wird gleichzeitig  $\text{NAD(P)}^+$  zu  $\text{NAD(P)H}$  reduziert. Für diese Reaktion konnten in Transkriptionsexperimenten drei Gene für Alkohol-Dehydrogenasen identifiziert werden, die verstärkt bei Verwertung von Betain und Ethanol exprimiert werden. Unter diesen Genen war neben CLJU\_c23220 und CLJU\_c39950 auch CLJU\_c24860, das bei Wachstum auf Synthesegas ebenfalls verstärkt exprimiert wird. Der nächste Schritt von Acetaldehyd zu Acetat wird von CLJU\_c20210 (Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase) und CLJU\_c24130 (W-haltige Aldehyd-Oxidoreduktase) katalysiert. Ein zweites Gen für eine Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (CLJU\_c20110) zeigt jedoch keine Induktion. Im Gegensatz dazu ist die Transkription dieses Gens bei Wachstum auf Synthesegas und der Bildung von Ethanol zusätzlich zu den beiden anderen Genen im Vergleich zur Standardbedingung ebenfalls hochreguliert. Ein weiterer Unterschied ist das Expressionsverhältnis der Aldehyd-Oxidoreduktasen. Bei der Bildung von Ethanol während des Wachstums auf Synthesegas wurden die Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktasen stärker induziert als die Wolfram-haltige Aldehyd-Oxidoreduktase (CLJU\_c24130). Bei Wachstum auf Betain und Ethanol ist das Expressionsverhältnis der beiden induzierten Gene umgekehrt.

Ausgehend von den Transkriptionsanalyse-Daten wird folgendes Reaktionsschema vorgeschlagen: Bei der Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat wird Ferredoxin reduziert, das am Rnf-Komplex wieder regeneriert werden kann, indem die Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  übertragen werden. Das bei der Oxidation von Ethanol entstandene  $\text{NAD(P)H}$  wird durch die Thioredoxin:Disulfid-Reduktase reoxidiert und gleichzeitig das oxidierte Thioredoxin reduziert (siehe Abb. 51).





**Abb. 51: Schematische Darstellung der beteiligten Gene an der Reduktion von Betain und der Oxidation von Ethanol.** Die mit ihren Gen-IDs angegebenen Gene wurden im Vergleich zu auf Fruktose gewachsenen Zellen verstärkt exprimiert.

Im Rahmen der Reduktion von Betain und Oxidation von Ethanol werden kein  $\text{CO}_2$  oder andere Intermediate gebildet, die in den Wood-Ljungdahl-Weg eingeschleust werden können. Dies spiegelt sich auch in den Transkriptionsanalysen wider, da die Gene dieses Stoffwechselweges im Vergleich zum Wachstum auf Fruktose bzw. auf  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  leicht reprimiert sind. Jedoch deuten relativ starke Fluoreszenzsignale in den DNA-Microarray-Experimenten bzw. niedrige  $C_T$ -Werte in den real-time Experimenten auf eine konstitutiv hohe Expression dieser Gene hin. Die Anwesenheit von  $\text{CO}_2$  besitzt vermutlich einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Transkription der Gene des autotrophen Stoffwechsels.

#### 4.3. Entwicklung und Etablierung von Methoden zum genetischen Arbeiten mit *C. ljungdahlii*

Voraussetzung für das genetische Arbeiten mit Mikroorganismen ist die Möglichkeit, diese vereinzeln zu können. Da *C. ljungdahlii* auf Agarplatten schlecht wächst, wurden verschiedene Medien und Methoden ausprobiert, Zellen zu vereinzeln. Es wurde ein Vollmedium und das PETC-Medium getestet und die Zellen auf Agarplatten, eingegossen in Agar in Petrischalen bzw. in Agarshakes. Das beste Ergebnis lieferte die Kultivierung in Agarshakes, da auf Agarplatten schon bei der Kultivierung des Wildtyps nur sehr wenige

bzw. keine Kolonien zu beobachten waren. Dies deutet auf eine hohe Sauerstoff-Empfindlichkeit des Organismus hin. Da die Zellen unter aeroben Bedingungen in die Agarshakes gegossen wurden, war es nötig, dass zusätzliches Reduktionsmittel zugegeben wurde. Wildtyp-Kolonien konnten zwar auch bei normaler Raumluft gepickt werden, die Hungate-Röhrchen mussten jedoch sofort mit N<sub>2</sub> begast werden. Bei Vereinzeln von transformierten Zellen mussten die Kolonien unter anaeroben Bedingungen gepickt werden, da sonst kein Wachstum zu beobachten war. Dies liegt vermutlich an der doppelten Belastung der Zellen durch O<sub>2</sub>- und Antibiotikastress bei Raumluft.

Eine weitere Voraussetzung für das genetische Arbeiten ist das Vorhandensein eines zuverlässigen Transformationsprotokolls. Clostridien sind generell schwierig zu transformieren, wobei die Effizienz im Vergleich zu anderen Organismen sehr gering ist. Außerdem ist die Transformationseffizienz stark artspezifisch. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das schon existierende Elektroporationsprotokoll von Michael Köpke leicht modifiziert und mit einer geringeren Spannung gearbeitet, so dass eine höhere Vitalität der Zellen nach dem Puls erreicht werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit, Plasmide in Bakterien einzubringen, ist die Konjugation. Konjugative Plasmide besitzen einen *origin of transfer* und wurden schon erfolgreich in andere Clostridiumarten wie *C. beijerinckii*, *C. botulinum*, *C. difficile* oder *C. perfringens* angewandt (Heap *et al.*, 2007; Heap *et al.*, 2009; Purdy *et al.*, 2002). Auch bei *C. ljungdahlii* wurde eine Konjugation mit *E. coli* bzw. *B. subtilis* versucht, ausschließlich die Konjugation mit dem Plasmid pUB110 von *B. subtilis* ergab Konjuganten. Zusätzlich war hier eine Gegenselektion von *B. subtilis* mit Antibiotika nicht erforderlich, da das Bakterium in dem hier verwendeten Medium unter anaeroben Bedingungen nicht wachsen kann. Bei Konjugation mit *E. coli* konnten keine Konjuganten erhalten werden. Dies kann an einer Sensitivität von *C. ljungdahlii* auf das Antibiotikum zur negativen Selektion von *E. coli* oder an einem nichtfunktionierenden *oriT* liegen. Der Nachteil an der Konjugation mit *B. subtilis* ist, dass jedes Plasmid erst in diesen Organismus eingebracht werden muss. *C. ljungdahlii* wurde in dieser Arbeit hauptsächlich mit Elektroporation transformiert, nachdem sich diese Methode als am effizientesten erwiesen hatte.

Desweiteren wurde ausgetestet, welche Plasmide zum Arbeiten in *C. ljungdahlii* geeignet sind. Dafür wurden Plasmide mit verschiedenen Replikons und Antibiotikaresistenzgenen genutzt bzw. neu erstellt. Replikons spielen bei der Transformationseffizienz, der Plasmidstabilität und der Kopienzahl eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde

die Stabilität von Plasmiden mit den Replikationsursprüngen von pIM13, pAM $\alpha$ , pAM $\beta$ , pE194, pT181cop-608 und pIP404 getestet, die z.T. schon in andere *Clostridium*-Arten wie *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutyricum* oder *C. perfringens* mehr oder weniger effizient transformiert wurden (Bannam & Rood, 1993; Soucaille & Papoutsakis; Swinfield *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 2012). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der Plasmide bei den verschiedenen Arten z. T. stark variierte (Heap *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2012).

Tab. 44 gibt einen Überblick der in dieser Arbeit in *C. ljungdahlii* auf Stabilität getesteten Plasmide. Die größte Stabilität wiesen dabei Plasmide mit dem Replikationsursprung von pIM13 und pUB110 auf, jedoch konnte keines dieser Plasmide dauerhaft in der Zelle etabliert werden. Ein Grund für das Verlieren der Plasmide könnte deren Herkunft sein. Die meisten verwendeten und etablierten Plasmide wurden aus den Gattungen *Streptococcus* bzw. *Bacillus* isoliert, so dass diese häufig nicht optimal in *Clostridium*-Arten funktionieren. Bei zukünftigen Versuchen sollten Plasmide mit Replikons ausgetestet werden, die aus anderen Clostridien isoliert wurden. Ein Replikationsursprung, der z. T. schon verwendet wird, stammt aus einem Plasmid von *C. perfringens* (Heap *et al.*, 2009). Auch Plasmide anderer *Clostridium*-Arten wie *C. kluyveri*, *C. tetani* oder *C. botulinum* könnten als Grundlage für clostridienspezifische Vektoren geeignet sein (Brüggemann *et al.*, 2003; Heap *et al.*, 2007; Heap *et al.*, 2009; Seedorf *et al.*, 2008). Da für *C. ljungdahlii* nicht bekannt ist, ob es Stämme mit Plasmiden gibt, kann man zurzeit kein Plasmid mit artspezifischem Replikon herstellen.

Diese Instabilität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wiederum ist bei der Verwendung des ClosTron-Systems von Vorteil, denn bei diesem System sollen die Plasmide nach der Insertion des Introns schnell verloren werden, damit das Intron stabil integriert bleibt. Da bei wiederholten Versuchen, das Intron nicht in das Genom von *C. ljungdahlii* integriert ist, wurden die Promotoren des Introns und der Transposase gegen Promotoren spezifisch für *C. ljungdahlii* ausgetauscht. Dafür wurden die Promotoren des *pta*-Gens und von CLJU\_c11350, einem Regulatorgen vor dem *rnf*-Operon ausgesucht. Bei beiden Genen konnte anhand der Microarray-Experimente gezeigt werden, dass sie in der logarithmischen Phase aktiv sind. Nach dem Austausch der Promotoren konnten nach der Transformation von *C. ljungdahlii* und einer Passage in Medium mit dem Selektionsmarker Kanamycin, Clarithromycin-resistente Kolonien isoliert werden. Durch PCR mit spezifischen Primern wurde der Nachweis erbracht, dass das Intron in das Genom integriert wurde. Es wurden

Integrationen in zwei verschiedene Zielsequenzen getestet, jedoch fand diese nicht in der Zielsequenz statt, sondern an einer anderen Stelle, die nicht identifiziert werden konnte.

Eine andere Methode zur Erzeugung von Mutanten ist die markerfreie Deletion von Genen über homologe Regionen auf dem Vektor. Damit der Vektor nach der ersten homologen Rekombination gezwungen ist, wieder aus dem Genom herauszurekombinieren, ist ein Marker zur negativen Selektion von Vorteil. In der vorliegenden Arbeit wurde ein negativer Selektionsmarker gesucht, der in *C. ljungdahlii* benutzt werden kann. Ein bekanntes System, das schon in *C. acetobutylicum* zum Einsatz kommt, ist das *upp*-System. Dafür muss der Organismus jedoch sensitiv auf das Basenanalogon 5-Fluorouracil reagieren. Dies ist jedoch bei *C. ljungdahlii* nicht der Fall, da bis zu einer getesteten Konzentration von 1mg/ml normales Wachstum zu beobachten war. Auch 5-Thioguanin konnte von *C. ljungdahlii* abgebaut werden. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass der Organismus aus dem Mist eines Hühnerhofes isoliert wurde, in dem normalerweise eine hohe Konzentration von Harnsäure, einem Abbauprodukt von Purinen zu finden ist. Ein weiterer negativer Selektionsmarker ist das *sacB*-Gen, das Saccharose zu Levan umwandelt. Voraussetzung für die Verwendung dieses Markers ist, dass kein *sacB*-Gen im Genom vorhanden ist und dass Saccharose nicht verstoffwechselt werden kann. Dieses System wurde bisher hauptsächlich in Gram-negativen Organismen verwendet, bei denen das hochmolekulare Levan das Periplasma verstopft (Reyrat *et al.*, 1998). In Gram-positiven Organismen wurde dieses System bisher nur in den hoch-GC-Organismen *Corynebacterium glutamicum* und *Mycobacterium* getestet und erfolgreich verwendet (Jackson *et al.*, 2001; Jäger *et al.*, 1992; Mimitsuka *et al.*, 2007). Auch bei Versuchen in *C. ljungdahlii* zeigte sich, dass *sacB* als negativer Selektionsmarker geeignet ist. Es wurden zwei Plasmide erstellt, bei denen *sacB* einerseits unter der Kontrolle des ursprünglichen Promotors (pCH2), andererseits zusätzlich unter der Kontrolle des Thiolase-Promotors von *C. acetobutylicum* steht (pSOS*sacB*). Jedoch funktionierte nur der Vektor mit dem zusätzlichen Thiolase-Promotor. In Anwesenheit von Clarithromycin und 10% Saccharose im Medium konnte *C. ljungdahlii* mit dem Plasmid nicht wachsen. In Medium mit Saccharose ohne Clarithromycin konnte der Organismus zwar wachsen, hatte jedoch das Plasmid verloren, was mittels PCR nachgewiesen werden konnte.

Der nächste Schritt zur Erstellung eines Deletionssystems durch homologe Rekombination wäre die Erstellung eines Deletionsvektors, ihn anschließend in *C. ljungdahlii* einzubringen um im Genom eine Deletion zu erzeugen.

#### 4.4. Biotechnologisches Potential

Durch den steigenden Energiebedarf der Weltbevölkerung werden in absehbarer Zeit die Reserven an fossilen Brennstoffen erschöpft sein. Schon jetzt wird versucht, Kraftstoffe und Chemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen herzustellen. Beispiele dafür sind die Herstellung von Bioethanol oder Butanol aus Zuckern oder Cellulose. Butanol wird hauptsächlich durch die ABE-(Aceton-Butanol-Ethanol)-Fermentation mit Hilfe von verschiedenen Clostridienarten (z. B. *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*) produziert. Allerdings werden für die Butanol- und Bioethanolherstellung Zucker aus Melassen, Stärke aus Getreide oder auch in China aus Süßkartoffeln verwendet (Ezeji *et al.*, 2005). Dies ist bei steigenden Rohstoffpreisen, Nahrungsmittelknappheit und zunehmender Weltbevölkerung jedoch keine dauerhafte Lösung des Energieproblems.

Ein weiteres mögliches Substrat zur Herstellung von verschiedenen Chemikalien und Lösungsmittel ist Synthesegas, das preiswert und relativ einfach herzustellen ist. Hauptsächlich wird es durch Kohlevergasung produziert, außerdem entsteht es durch Verschwelung von Biomasse und städtischen Abfällen oder durch chemisches Recycling von Plastik (Weißermel & Arpe, 2003). Die Hauptbestandteile von Synthesegas sind CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>. Mit Hilfe von chemischen oder auch biologischen Prozessen kann das Gasgemisch in Kraftstoffe oder Chemikalien wie Methan, Methanol, Acetat oder Ethanol konvertiert werden (Klasson *et al.*, 1992). Homoacetogene Bakterien wie *C. ljungdahlii* können z. T. autotroph auf diesem Substrat wachsen und produzieren dabei Acetat und Ethanol.

Für die Nutzung von *C. ljungdahlii* als Produzent von Acetat und Ethanol wurde ein Patent angemeldet (Gaddy & Clausen, 1992). Forschungen zur Nutzung von *C. ljungdahlii* als Produktionsorganismus sind schon so weit fortgeschritten, dass Firmen wie LanzaTech, BriEnergy und Coskata Pilotanlagen zur Produktion von Ethanol und Acetat aus Synthesegas in Betrieb genommen haben (BRI Energy; Gaddy, 2000). Ein weiteres interessantes Nebenprodukt von *C. ljungdahlii* bei autotrophem Wachstum – 2,3-Butandiol – wurde vor Kurzem entdeckt (Köpke *et al.*, 2011). Dieser Stoff dient u. a. als Treibstoffzusatz und Lösungsmittel und wird als Basischemikalie für die Herstellung von Kunststoffen und Epoxidharzen verwendet (Endres & Siebert-Raths, 2009). Außerdem wurden Versuche unternommen, Gene zur Butanolsynthese aus *C. acetobutylicum* in *C. ljungdahlii* einzubringen. Dadurch konnte der Organismus geringe Mengen Butanol aus Synthesegas herstellen, jedoch konnte der Versuch nicht erfolgreich wiederholt werden (Köpke, 2009b).

*C. ljungdahlii* hat aufgrund seiner Fähigkeit, auf Synthesegas zu wachsen und dabei Acetat, Ethanol und geringe Mengen 2,3-Butandiol zu produzieren, das Potential, in Zukunft ein wichtiger Organismus zur Synthese von Biokraftstoffen zu werden. Die Forschungen stehen dabei noch am Anfang, jedoch gibt es schon vielversprechende gentechnische Ansätze das Potential von *C. ljungdahlii* weiter auszuschöpfen, z. B. Butanolproduktion durch das Einbringen von Genen zur Butanolsynthese.

### 4.5. Ausblick

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *C. ljungdahlii* bietet die Möglichkeit, das gesamte stoffwechselphysiologische und bioenergetische Potential dieses wenig erforschten Organismus während des autotrophen und heterotrophen Wachstums zu studieren. Bei der Rekonstruktion des Stoffwechsels zeigte sich eine gute Anpassung an das Habitat, aus dem er isoliert wurde, ebenso lässt sich eine große Flexibilität in Hinblick auf mögliche Substrate erahnen. Darüber hinaus steht mit der DNA-Microarray-Technik ein exzellentes Hilfsmittel zur Verfügung, um die Unterschiede in den Genexpressionsmustern während des Wachstums unter verschiedenen Bedingungen aufzuzeigen und zu analysieren. Für weitere Untersuchungen der Transkription, vor allem unter autotrophen Bedingungen wäre es wünschenswert, Transkriptionsanalysen von kontinuierlichen Kulturen anzufertigen, da hier sämtliche, wachstumsabhängige Regulationen fast vollständig verschwinden.

Bei Wachstumsversuchen von *C. ljungdahlii* auf Glukose konnten deutliche Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zu auf Fruktose gewachsenen Zellen festgestellt werden. Ebenso scheinen neben Acetat und Ethanol zusätzliche Produkte wie Glykolat gebildet zu werden. Hier könnte man durch andere Messmethoden, z. B. durch LC-MS, ein exakteres Abbild des Produktspektrums und der Bildung im Verlauf des Wachstums erzielen.

Zusätzlich sollte man die Entwicklung von genetischen Systemen zur Deletion von Genen weiterverfolgen, um dadurch einen besseren Einblick in die stoffwechselphysiologischen Prozesse während des Wachstums zu bekommen bzw. die Funktion von hypothetischen Genen herauszufinden, die unter verschiedenen Bedingungen eine Regulation der Genexpression aufweisen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erste Versuche zur Etablierung von zwei verschiedenen Deletionssystemen gemacht. Einerseits das ClosTron-System, mit dem gezielt ein Intron in einer Zielsequenz inseriert werden kann. Im Verlauf

dieser Arbeit konnte zwar gezeigt werden, dass das Intron in das Genom springt, jedoch nicht in die vorgesehene Sequenz. Hier sollten verschiedene Zielsequenzen für ein Gen getestet werden, um eine Insertion in das anvisierte Gen zu erreichen. Um ein markerfreies Deletionssystem zu entwickeln, wurden verschiedene negative Selektionsmarker getestet, von denen nur *sacB* effektiv in *C. ljungdahlii* nutzbar ist. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnte man versuchen, Deletionsvektoren aus pSOSSacB mit homologen Flanken zu konstruieren, um gezielt Gene zu deletieren, ohne polare Effekte in Operons entstehen zu lassen, wie dies bei ClosTron der Fall ist. Bioenergetisch interessant wäre es, einzelne oder alle Gene des Rnf-Komplexes zu deletieren, um überprüfen zu können, welche Auswirkungen dies auf das heterotrophe bzw. autotrophe Wachstum von *C. ljungdahlii* hat. Weitere Ziele wären verschiedene Regulatoren, z. B. CLJU\_c11350, der direkt *upstream* vor dem *rnf*-Operon liegt.





## 5. Zusammenfassung

1. Das Genom von *C. ljungdahlii* besteht aus einem Chromosom mit 4,630,065 bp und einem GC-Gehalt von 31 mol%. Es wurden 4296 CDS, 72 tRNA und 9 ribosomale RNA-Operons identifiziert, von denen 77,4% auf dem *leading strand* kodiert sind.
2. Die Gene des Wood-Ljungdahl-Wegs konnten identifiziert werden. Mit Ausnahme der drei Formiat-Dehydrogenasen liegen diese alle in einem großen Cluster. Zwei der drei Formiat-Dehydrogenasen sind Selenoproteine.
3. Gene zur Verwertung von Zuckern konnten ebenfalls identifiziert werden. *C. ljungdahlii* besitzt zwei Fruktose/Mannitol-spezifische PTS-Systeme. Die Gene der Glycolyse und Gluconeogenese sind vorhanden und liegen z. T. einzeln, z. T. in zwei Clustern im Genom vor. Ebenso konnten Gene identifiziert werden, die für Enzyme des reduktiven Pentose-Phosphat-Wegs kodieren.
4. Bisher wurde zwischen Organismen bezüglich ihrer Energiekonservierung in zwei Gruppen eingeteilt: H<sup>+</sup>-abhängig mit Cytochromen oder Na<sup>+</sup>-abhängig mit Rnf-Komplex. *C. ljungdahlii* scheint einen neuen H<sup>+</sup>-abhängigen Typ der Energiekonservierung zu repräsentieren, da er sowohl Na<sup>+</sup>-unabhängig wachsen kann, als auch im Genom nur Gene für einen Rnf-Komplex gefunden wurden.
5. Die Gene des Rnf-Komplexes sind in einem Operon organisiert. Dieses Operon besitzt zwei Transkriptionsstartpunkte, von denen der eine direkt vor *rnfC* liegt, der zweite vor einem Regulatorgen (*CLJU\_c11350*), das *upstream* von *rnfC* lokalisiert ist. Die Operonstruktur und die Transkriptionsstartpunkte wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmt.
6. In Wachstumsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass *C. ljungdahlii* neben Ammonium auch Nitrat und Harnsäure als N-Quellen verwerten kann.
7. Es konnte in Wachstumsexperimenten gezeigt werden, dass *C. ljungdahlii* Betain und Ethanol zusammen in einer Stickland-ähnlichen Reaktion verwerten kann und dabei

- Acetat und Trimethylamin produziert. In Transkriptionsanalysen konnten darüber hinaus Gene identifiziert werden, die unter diesen Wachstumsbedingungen verstärkt exprimiert werden, darunter eine Betain-Reduktase, Alkohol-Dehydrogenasen, Aldehyd-Oxidoreduktasen und ein Operon mit Genen der Selenoproteinbiosynthese.
8. *C. ljungdahlii* kann mit Fruktose als C-Quelle in Medium bis 3,5% Ethanol und mit Betain als Co-Substrat bis 5,83% Ethanol wachsen, ohne dass negative Effekte gemessen werden konnten. Kein Wachstum wurde mit Fruktose ab einer Konzentration von 1,1 M Ethanol und mit Betain als Cosubstrat ab 1,3 M Ethanol beobachtet.
  9. Es konnte gezeigt werden, dass *C. ljungdahlii* bei autotrophem Wachstum in Anwesenheit von Nitrat im Medium eine höhere Zelldichte und Wachstumsrate erreicht, so dass man vermuten kann, dass Nitrat gegenüber CO<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor bevorzugt wird.
  10. *C. ljungdahlii* kann sowohl auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> als auch auf Synthesegas, einem Gemisch aus CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> wachsen. Bei Wachstum auf Synthesegas werden im Gegensatz zu Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> größere Mengen an Ethanol gebildet. Mit beiden Substraten wurden Transkriptionsanalysen im Vergleich zu Wachstum auf Fruktose durchgeführt. Es konnten zwei Alkohol-Dehydrogenasen, zwei Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase und eine Wolfram-abhängige Aldehyd-Oxidoreduktase identifiziert werden, die verantwortlich sind für die Bildung von Ethanol. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei Wachstum mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> eine Hydrogenase um den Faktor 2 – 2,5 höher exprimiert wird als bei Wachstum auf Fruktose.
  11. In Wachstumsexperimenten konnte gezeigt werden, dass *C. ljungdahlii* nach einer Adaptionszeit auf Glukose wachsen kann und Acetat und geringe Mengen Ethanol und Glykolat produziert. In Transkriptionsanalysen konnten zwei Pyruvat:Formiat-Lyasen und ein Gencluster mit Mikrokompartimentproteinen identifiziert werden, die im Vergleich zu Wachstum auf Fruktose stark induziert sind.
  12. Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnten bei Wachstum mit D-Xylose und L-Arabinose das entsprechenden Xylose- bzw. Arabinoseoperon identifiziert werden.

Ebenso wurde der Zuckerverbrauch und die Bildung von Acetat während das Wachstum bestimmt.

13. Es wurde das Plasmid pSOS*sacB* konstruiert, mit dessen Hilfe gezeigt werden konnte, dass das Gen *sacB* unter der Kontrolle des Thiolase-Promotors von *C. acetobutylicum* in Anwesenheit von 10% Saccharose im Medium lethal für *C. ljungdahlii* ist.
14. Das ClosTron-System wurde an *C. ljungdahlii* angepasst und es konnte gezeigt werden, dass das Gruppe II Intron in das Genom inserieren kann.



## 6. Literaturverzeichnis

- Abrini, J., Naveau, H., & Nyns, E.-J. 1994. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. **Archives of Microbiology**, 161(4): 345-351.
- Achong, G. R., Rodriguez, A. M., & Spormann, A. M. 2001. Benzylsuccinate Synthase of *Azoarcus* sp. Strain T: Cloning, Sequencing, Transcriptional Organization, and Its Role in Anaerobic Toluene and m-Xylene Mineralization. **Journal of Bacteriology**, 183(23): 6763-6770.
- Ahmed, H., Ettema, T. J. G., Tjaden, B., Geerling, A. C. M., van der Oost, J., & Siebers, B. 2005. The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. **Biochem. J.**, 390(2): 529-540.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., Parker, B. A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G. R., & Wahl, G. M. 1979. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzoyloxymethyl paper. In W. Ray (Ed.), **Methods in Enzymology**, Vol. Volume 68: 220-242: Academic Press.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., & Stark, G. R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74(12): 5350-5354.
- Andreesen, J. R. 1994. Glycine metabolism in anaerobes. **Antonie van Leeuwenhoek**, 66(1): 223-237.
- Andreesen, J. R. 2004. Glycine reductase mechanism. **Curr Opin Chem Biol**, 8: 454 - 461.
- Andreesen, J. R., & Gottschalk, G. 1969. The occurrence of a modified Entner-Doudoroff pathway in *Clostridium acetivum*. **Archives of Microbiology**, 69(2): 160-170.
- Arkowitz, R. A., & Abeles, R. H. 1991. Mechanism of action of clostridial glycine reductase: isolation and characterization of a covalent acetyl enzyme intermediate. **Biochemistry**, 30: 4090 - 4097.
- Arnaud, M., Chastanet, A., & Débarbouillé, M. 2004. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 70(11): 6887-6891.
- Arnér, E. S. J., & Holmgren, A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, 267(20): 6102-6109.
- Backiel, J., Juarez, O., Zagorevski, D. V., Wang, Z., Nilges, M. J., & Barquera, B. 2008. Covalent Binding of Flavins to RnfG and RnfD in the Rnf Complex from *Vibrio cholerae*. **Biochemistry**, 47(43): 11273-11284.
- Badger, J. H., & Olsen, G. J. 1999. CRITICA: coding region identification tool invoking comparative analysis. **Molecular Biology and Evolution**, 16(4): 512-524.
- Balch W.E., S. S., Tanner R.S., Wolfe R.S. 1977. Acetobacterium, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. **Int J Syst Bacteriol**, 27: 355-361.
- Banerjee, R., & Ragsdale, S. W. 2003. The Many Faces of Vitamin B12: Catalysis by Cobalamin-dependent Enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, 72(1): 209-247.

- Bannam, T. L., & Rood, J. I. 1993. *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* Shuttle Vectors That Carry Single Antibiotic Resistance Determinants. **Plasmid**, 29(3): 233-235.
- Barata, B. A. S., LeGall, J., & Moura, J. J. G. 1993. Aldehyde oxidoreductase activity in *Desulfovibrio gigas*: In vitro reconstitution of an electron-transfer chain from aldehydes to the production of molecular hydrogen. **Biochemistry**, 32(43): 11559-11568.
- Barata, B. A. S., Liang, J., Moura, I. I., Legall, J., Moura, J. J. G., & Hanh Huynh, B. 1992. Mössbauer study of the native, reduced and substrate-reacted *Desulfovibrio gigas* aldehyde oxidoreductase. **European Journal of Biochemistry**, 204(2): 773-778.
- Barker, H. A. 1937. The production of caproic and butyric acids by the methane fermentation of ethyl alcohol. **Archives of Microbiology**, 8(1): 415-421.
- Barker, H. A., & Beck, J. V. 1941.  
The Fermentative Decomposition of Purines by *Clostridium acidi-urici* and *Clostridium cylindrosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, 141(1): 3-27.
- Barondeau, D. P., & Lindahl, P. A. 1997. Methylation of Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* and Mechanism of Acetyl Coenzyme A Synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, 119(17): 3959-3970.
- Baronofsky, J. J., Schreurs, W. J. A., & Kashket, E. R. 1984. Uncoupling by Acetic Acid Limits Growth of and Acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 48(6): 1134-1139.
- Barquera, B., Zhou, W., Morgan, J. E., & Gennis, R. B. 2002. Riboflavin is a component of the Na<sup>+</sup>-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99(16): 10322-10324.
- Batista, A. P., Fernandes, A. S., Louro, R. O., Steuber, J., & Pereira, M. M. 2010. Energy conservation by *Rhodothermus marinus* respiratory complex I. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1797(4): 509-515.
- Batista, A. P., & Pereira, M. M. 2011. Sodium influence on energy transduction by complexes I from *Escherichia coli* and *Paracoccus denitrificans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1807(3): 286-292.
- Bender, G., & Ragsdale, S. W. 2010. Evidence That Ferredoxin Interfaces with an Internal Redox Shuttle in Acetyl-CoA Synthase during Reductive Activation and Catalysis. **Biochemistry**, 50(2): 276-286.
- Berks, B. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1232(3): 97-173.
- Bernalier, A., Willems, A., Leclerc, M., Rochet, V., & Collins, M. D. 1996. *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov., a new H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces. **Archives of Microbiology**, 166(3): 176-183.
- Bernhard, K., Schrempf, H., & Goebel, W. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 133(2): 897-903.
- Bertsova, Y. V., & Bogachev, A. V. 2004. The origin of the sodium-dependent NADH oxidation by the respiratory chain of *Klebsiella pneumoniae*. **FEBS Letters**, 563(1-3): 207-212.

- Bettegowda, C., Huang, X., Lin, J., Cheong, I., Kohli, M., Szabo, S. A., Zhang, X., Diaz, L. A., Velculescu, V. E., Parmigiani, G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Zhou, S. 2006. The genome and transcriptomes of the anti-tumor agent *Clostridium novyi*-NT. **Nat Biotech**, 24(12): 1573-1580.
- Biegel, E., & Müller, V. 2010. Bacterial Na<sup>+</sup>-translocating ferredoxin:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107(42): 18138-18142.
- Biegel, E., Schmidt, S., González, J., & Müller, V. 2011. Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 68(4): 613-634.
- Biegel, E., Schmidt, S., & Müller, V. 2009. Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. **Environmental Microbiology**, 11(6): 1438-1443.
- Blanco-Rivero, A., Leganés, F., Fernández-Valiente, E., & Fernández-Piñas, F. 2009. mrpA (all1838), a gene involved in alkali and Na<sup>+</sup> sensitivity, may also have a role in energy metabolism in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Journal of Plant Physiology**, 166(14): 1488-1496.
- Boeke, J. D., Croute, F., & Fink, G. R. 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. **Molecular and General Genetics MGG**, 197(2): 345-346.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., & Falkow, S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. **Gene**, 2(2): 95-113.
- Breznak, J. A., & Brune, A. 1994. Role of Microorganisms in the Digestion of Lignocellulose by Termites. **Annual Review of Entomology**, 39(1): 453-487.
- BRI Energy.
- Bruant, G., Lévesque, M.-J., Peter, C., Guiot, S. R., & Masson, L. 2010. Genomic Analysis of Carbon Monoxide Utilization and Butanol Production by *Clostridium carboxidivorans* Strain P7<sup>T</sup>. **PLoS ONE**, 5(9): e13033.
- Brüggemann, H., Bäumer, S., Fricke, W. F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martínez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A., & Gottschalk, G. 2003. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100(3): 1316-1321.
- Buckel, W. 2001. Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 57(3): 263-273.
- Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., & Wilmotte, A. 2010. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. **Microbiology**, 156(6): 1575-1588.
- Chang, A. C., & Cohen, S. N. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. **Journal of Bacteriology**, 134(3): 1141-1156.
- Chiba, S., & Ishimoto, M. 1973. Ferredoxin-linked Nitrate Reductase from *Clostridium perfringens*. **J Biochem**, 73(6): 1315-1318.

- Clark, J. E., & Ljungdahl, L. G. 1984. Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, an iron-sulfur flavoprotein from *Clostridium formicoaceticum*. **J. Biol. Chem.**, 259(17): 10845-10849.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., & Farrow, J. A. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **Int J Syst Bacteriol**, 44: 812 - 826.
- Conway, T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMS Microbiology Letters**, 103(1): 1-27.
- Cotter, J., Chinn, M., & Grunden, A. 2009a. Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 32(3): 369-380.
- Cotter, J. L., Chinn, M. S., & Grunden, A. M. 2009b. Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. **Enzyme and Microbial Technology**, 44(5): 281-288.
- Curatti, L., Brown, C. S., Ludden, P. W., & Rubio, L. M. 2005. Genes required for rapid expression of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102(18): 6291-6296.
- Dangel, W., Schulz, H., Diekert, G., König, H., & Fuchs, G. 1987. Occurrence of corrinoid-containing membrane proteins in anaerobic bacteria. **Archives of Microbiology**, 148(1): 52-56.
- Daniel, S. L., Keith, E. S., Yang, H., Lin, Y.-S., & Drake, H. L. 1991. Utilization of methoxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: Expression and specificity of the co-dependent O-demethylating activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 180(1): 416-422.
- Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernede, X., Lindahl, P. A., & Fontecilla-Camps, J. C. 2003. Ni-Zn-[Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>] and Ni-Ni-[Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>] clusters in closed and open [alpha] subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. **Nat Struct Mol Biol**, 10(4): 271-279.
- Das, A., Hugenholtz, J., Van Halbeek, H., & Ljungdahl, L. G. 1989. Structure and function of a menaquinone involved in electron transport in membranes of *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. **Journal of Bacteriology**, 171(11): 5823-5829.
- Das, A., & Ljungdahl, L. G. 1997. Composition and primary structure of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase from the obligately anaerobic bacterium *Clostridium thermoaceticum*. **Journal of Bacteriology**, 179(11): 3746-3755.
- Das, A., & Ljungdahl, L. G. 2003. Electron-transport system in acetogens. In L. G. Ljungdahl, M. W. Adams, L. L. Barton, J. G. Ferry, & J. M. K. (Eds.), **Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria**: 191-204. New York, NY (USA): Springer.
- Das A., F. Z.-Q., Tempel W., Liu Z.-J., Chang J., Chen L., Lee D., Zhou W., Xu H., Shaw N., Rose J. P., Ljungdahl L. G. 2007. Characterization of a corrinoid protein involved in the C1 metabolism of strict anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 67(1): 167-176.



- Datar, R. P., Shenkman, R. M., Cateni, B. G., Huhnke, R. L., & Lewis, R. S. 2004. Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. ***Biotechnology and Bioengineering***, 86(5): 587-594.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. 1998. Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, 62(2): 434-464.
- Delcher, A. L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., & Salzberg, S. L. 1999. Improved microbial gene identification with GLIMMER. ***Nucleic Acids Research***, 27(23): 4636-4641.
- DeRisi, J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M., Chen Y., Su Y.A., & J.M., T. 1996. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. ***Nat Genet***, 14(4): 457-460.
- Des Purdy, Triona A. T., O'Keeffe Michael, Elmore Mike Herbert, Anne McLeod, Monika Bokori-Brown, Anna Ostrowski, & Minton, N. P. 2002. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. ***Molecular Microbiology***, 46(2): 439-452.
- Desnoues, N., Lin, M., Guo, X., Ma, L., Carreño-Lopez, R., & Elmerich, C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. ***Microbiology***, 149(8): 2251-2262.
- Diekert, G., & Wohlfarth, G. 1994. Metabolism of homoacetogens. ***Antonie van Leeuwenhoek***, 66(1): 209-221.
- Diekert, G. B., & Thauer, R. K. 1978. Carbon Monoxide Oxidation by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium formicoaceticum*. ***Journal of Bacteriology***, 136(2): 597-606.
- Doukov, T., Seravalli, J., Stezowski, J. J., & Ragsdale, S. W. 2000. Crystal structure of a methyltetrahydrofolate- and corrinoid-dependent methyltransferase. ***Structure (London, England : 1993)***, 8(8): 817-830.
- Drake H.L., Küsel K., & C., M. 2004. Acetogenic Prokaryotes. In D. M., F. S., R. E., S. K.-H., & S. E. (Eds.), ***The Prokaryotes, 3rd Edition***. New York: Springer Verlag.
- Drake, H. L., Hu, S. I., & Wood, H. G. 1981. Purification of five components from *Clostridium thermoaceticum* which catalyze synthesis of acetate from pyruvate and methyltetrahydrofolate. Properties of phosphotransacetylase. ***Journal of Biological Chemistry***, 256(21): 11137-11144.
- Drake, H. L., Küsel, K., & Matthies, C. 2006. Acetogenic prokaryotes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stakebrandt (Eds.), ***The Prokaryotes, 3rd edition***, Vol. 2: 354-420. New York, NY (USA): Springer.
- Dürre, P., Fischer, R.-J., Kuhn, A., Lorenz, K., Schreiber, W., Stürzenhofecker, B., Ullmann, S., Winzer, K., & Sauer, U. 1995. Solventogenic enzymes of *Clostridium acetobutylicum*: catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. ***FEMS Microbiology Reviews***, 17(3): 251-262.
- Earl, C. D., Ronson, C. W., & Ausubel, F. M. 1987. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC*, and *fixX* genes. ***Journal of Bacteriology***, 169(3): 1127-1136.
- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. ***Plasmid***, 1(4): 584-588.

- Eden, G., & Fuchs, G. 1982. Total synthesis of acetyl coenzyme a involved in autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Acetobacterium woodii*. **Archives of Microbiology**, 133(1): 66-74.
- Edgren, T., & Nordlund, S. 2004. The *fixABCX* Genes in *Rhodospirillum rubrum* Encode a Putative Membrane Complex Participating in Electron Transfer to Nitrogenase. **Journal of Bacteriology**, 186(7): 2052-2060.
- Endres, H.-J., & Siebert-Raths, A. 2009. **Technische Biopolymere. Rahmenbedingungen, Marktsituation, Herstellung, Aufbau und Eigenschaften**: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., & Soda, K. 1982. Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. Mammalian distribution and purification and properties of pig liver enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, 257(8): 4386-4391.
- Espinosa, M., Del Solar, G., Rojo, F., & Alonso, J. C. 1995. Plasmid rolling circle replication and its control. **FEMS Microbiology Letters**, 130(2-3): 111-120.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. 2005. Industrially relevant fermentations. In P. Dürre (Ed.), **Handbook on clostridia**: 797-812. Boca Raton, FL (USA): CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock Proteins, Molecular Chaperones and the Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology. **Annual Review of Physiology**, 61(1): 243-282.
- Fendrich, C., Hippe, H., & Gottschalk, G. 1990. *Clostridium halophilium* sp. nov. and *C. litorale* sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction. **Archives of Microbiology**, 154(2): 127-132.
- Fillinger, S., Boschi-Muller, S., Azza, S. d., Dervyn, E., Branlant, G., & Aymerich, S. 2000. Two Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases with Opposite Physiological Roles in a Nonphotosynthetic Bacterium. **Journal of Biological Chemistry**, 275(19): 14031-14037.
- Fischer F., Lieske R., & K., W. 1932. Biologische Umsetzung von Kohlenoxyd und Kohlensäure zu Methan. **Biochem. Z.**, 245: 2-12.
- Fleischmann, R., Adams, M., White, O., Clayton, R., Kirkness, E., Kerlavage, A., Bult, C., Tomb, J., Dougherty, B., Merrick, J., & al., e. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, 269(5223): 496-512.
- Fontaine F.E., Peterson W.H., McCoy E., Johnson M.J., & G., R. 1942. A new type of Glucose Fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n.sp. **J Bacteriol**, 43(6): 701-712.
- Fontaine, L., Meynial-Salles, I., Girbal, L., Yang, X., Croux, C., & Soucaille, P. 2002. Molecular Characterization and Transcriptional Analysis of *adhE2*, the Gene Encoding the NADH-Dependent Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase Responsible for Butanol Production in Alcohologenic Cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Journal of Bacteriology**, 184(3): 821-830.
- Frazier, C. L., San Filippo, J., Lambowitz, A. M., & Mills, D. A. 2003. Genetic Manipulation of *Lactococcus lactis* by Using Targeted Group II Introns: Generation of Stable Insertions without Selection. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(2): 1121-1128.

- Friedrich, T., & Scheide, D. 2000. The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases1 **FEBS Letters**, 479(1): 1-5.
- Fröstl, J. M., Seifritz, C., & Drake, H. L. 1996. Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. **Journal of Bacteriology**, 178(15): 4597-4603.
- Fujinaga, K., Taniguchi, Y., Sun, Y., Katayama, S., Minami, J., Matsushita, O., & Okabe, A. 1999. Analysis of genes involved in nitrate reduction in *Clostridium perfringens*. **Microbiology**, 145(12): 3377-3387.
- Fukaya, F., Promden, W., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., & Takabe, T. 2009. An Mrp-Like Cluster in the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Functions as a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(20): 6626-6629.
- Gaddy, J. 2000. Biological production of ethanol from waste gases with *Clostridium ljungdahlii*, Vol. United States Patent 6136577
- Gaddy, J. L., & Clausen, E. C. 1992. *Clostridium ljungdahlii* an anaerobic ethanol and acetate producing microorganism, Vol. U.S. Patent 612,211.
- Geerligs, G., Schönheit, P., & Diekert, G. 1989. Sodium dependent acetate formation from CO<sub>2</sub> in *Peptostreptococcus productus* (strain Marburg). **FEMS Microbiology Letters**, 57(3): 253-257.
- Genthner, B. R., Davis, C. L., & Bryant, M. P. 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, 42(1): 12-19.
- George, H. A., Johnson, J. L., Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., & Chen, J. S. 1983. Acetone, Isopropanol, and Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 45(3): 1160-1163.
- Goh, Y. J., Azcárate-Peril, M. A., O'Flaherty, S., Durmaz, E., Valence, F., Jardin, J., Lortal, S., & Klaenhammer, T. R. 2009. Development and Application of a upp-Based Counterselctive Gene Replacement System for the Study of the S-Layer Protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM, **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 75: 3093-3105.
- Gottwald, M., Andreesen, J. R., LeGall, J., & Ljungdahl, L. G. 1975. Presence of Cytochrome and Menaquinone in *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium thermoaceticum*. **Journal of Bacteriology**, 122(1): 325-328.
- Greening, R. C., & Leedle, J. A. Z. 1989. Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen. **Archives of Microbiology**, 151(5): 399-406.
- Griffin, A. M., Griffin, H. G., & Pearson, W. R. 1994. Using the FASTA Program to Search Protein and DNA Sequence Databases Computer Analysis of Sequence Data, Vol. 25: 365-389: Springer New York.
- Grimmler, C., Janssen, H., Krauß, D., Fischer, R. J., Bahl, H., Dürre, P., Liebl, W., & Ehrenreich, A. 2011. Genome-Wide Gene Expression Analysis of the Switch between Acidogenesis and Solventogenesis in Continuous Cultures of *Clostridium*

- acetobutylicum*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 20(1): 1-15.
- Guo, F.-B., Ou, H.-Y., & Zhang, C.-T. 2003. ZCURVE: a new system for recognizing protein-coding genes in bacterial and archaeal genomes. **Nucleic Acids Research**, 31(6): 1780-1789.
- Hamamoto, T., Hashimoto, M., Hino, M., Kitada, M., Seto, Y., Kudo, T., & Horikoshi, K. 1994. Characterization of a gene responsible for the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter system of alkalophilic *Bacillus* species strain C-125. **Molecular Microbiology**, 14(5): 939-946.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, 166(4): 557-580.
- Heap, J. T., Kuehne, S. A., Ehsaan, M., Cartman, S. T., Cooksley, C. M., Scott, J. C., & Minton, N. P. 2010. The Clostron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. **Journal of Microbiological Methods**, 80(1): 49-55.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P., & Minton, N. P. 2007. The Clostron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. **J Microbiol Methods**, 70: 452 - 464.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., & Minton, N. P. 2009. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. **Journal of Microbiological Methods**, 78(1): 79-85.
- Heider, J., & Böck, A. 1993. Selenium Metabolism in Microorganisms. In A. H. Rose (Ed.), **Advances in Microbial Physiology**, Vol. Volume 35: 71-109: Academic Press.
- Heijthuijsen, J. H. F. G., & Hansen, T. A. 1989. Anaerobic degradation of betaine by marine *Desulfobacterium* strains. **Archives of Microbiology**, 152(4): 393-396.
- Heise, R., Muller, V., & Gottschalk, G. 1989. Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. **J. Bacteriol.**, 171(10): 5473-5478.
- Herrmann, G., Jayamani, E., Mai, G., & Buckel, W. 2008. Energy Conservation via Electron-Transferring Flavoprotein in Anaerobic Bacteria. **J. Bacteriol.**, 190(3): 784-791.
- Hippe, H., Andreesen, J., & Gottschalk, G. 1992. The Genus *Clostridium* - Nonmedical. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, & K.-H. Schleifer (Eds.), **The Prokaryotes**, 3rd ed.: 1800-1866. New York: Springer Verlag.
- Hirsch, W., Schägger, H., & Fuchs, G. 1998. Phenylglyoxylate : NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (CoA benzoylating), a new enzyme of anaerobic phenylalanine metabolism in the denitrifying bacterium *Azoarcus evansii*. **European Journal of Biochemistry**, 251(3): 907-915.
- Hirst, J. 2003. The dichotomy of complex I: A sodium ion pump or a proton pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100(3): 773-775.
- Hofmann K., & Stoffel, W. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. **Biol. Chem. Hoppe-Seqler**, 374: 166.
- Hu, S. I., Pezacka, E., & Wood, H. G. 1984. Acetate synthesis from carbon monoxide by *Clostridium thermoaceticum*. Purification of the corrinoid protein. **Journal of Biological Chemistry**, 259(14): 8892-8897.
- Hugenholtz, J., Ivey, D. M., & Ljungdahl, L. G. 1987. Carbon monoxide-driven electron transport in *Clostridium thermoautotrophicum* membranes. **Journal of Bacteriology**, 169(12): 5845-5847.

- Hugenholtz, J., & Ljungdahl, L. G. 1989. Electron transport and electrochemical proton gradient in membrane vesicles of *Clostridium thermoautotrophicum*. **Journal of Bacteriology**, 171(5): 2873-2875.
- Huhnke, R., Lewis R.S., & R.S., T. 2008. Isolation and characterization of novel clostridial species., Vol. WO2008/028055. Internationales Patent.
- Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P., Burge, S., *et al.* 2012. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. **Nucleic Acids Research**, 40(D1): D306-D312.
- Imkamp, F., Biegel, E., Jayamani, E., Buckel, W., & Müller, V. 2007. Dissection of the Caffeate Respiratory Chain in the Acetogen *Acetobacterium woodii*: Identification of an Rnf-Type NADH Dehydrogenase as a Potential Coupling Site. **J. Bacteriol.**, 189(22): 8145-8153.
- Itaya, M., Sakaya, N., Matsunaga, S., Fujita, K., & Kaneko, S. 2006. Conjugational Transfer Kinetics of pLS20 between *Bacillus subtilis* in Liquid Medium. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 70(3): 740-742.
- Ivey, D. M., & Ljungdahl, L. G. 1986. Purification and characterization of the F1-ATPase from *Clostridium thermoaceticum*. **Journal of Bacteriology**, 165(1): 252-257.
- Jackson, M., Reinaldo Camacho, L., Gicquel, B., & Guilhot, C. 2001. Gene Replacement and Transposon Delivery Using the Negative Selection Marker *sacB*
- In T. Parish, & N. G. Stoker (Eds.), Vol. 54: 59-75: Humana Press.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G., & Wohlleben, W. 1992. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. **Journal of Bacteriology**, 174(16): 5462-5465.
- Janssen, H., Döring, C., Ehrenreich, A., Voigt, B., Hecker, M., Bahl, H., & Fischer, R.-J. 2010. A proteomic and transcriptional view of acidogenic and solventogenic steady-state cells of *Clostridium acetobutylicum* in a chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 87(6): 2209-2226.
- Jobin, M. P., Delmas, F., Garmyn, D., Diviès, C., & Guzzo, J. 1997. Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(2): 609-614.
- Jouanneau, Y., Jeong, H.-S., Hugo, N., Meyer, C., & Willison, J. C. 1998. Overexpression in *Escherichia coli* of the *rnf* genes from *Rhodobacter capsulatus*. **European Journal of Biochemistry**, 251(1-2): 54-64.
- Kaster, A.-K., Moll, J., Parey, K., & Thauer, R. K. 2011. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108(7): 2981-2986.
- Kazuko Okamura-Ikeda, Ohmura, Y., Fujiwara, K., & Motokawa, Y. 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. **European Journal of Biochemistry**, 216(2): 539-548.
- Keggins, K. M., Lovett, P. S., & Duvall, E. J. 1978. Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 75(3): 1423-1427.

- Keis, S., Shaheen, R., & Jones, D. T. 2001. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51(6): 2095-2103.
- Keller, K. L., Bender, K. S., & Wall, J. D. 2009. Development of a Markerless Genetic Exchange System for *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and Its Use in Generating a Strain with Increased Transformation Efficiency. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(24): 7682-7691.
- Kerscher, S., Dröse, S., Zickermann, V., & Brandt, U. 2008. The Three Families of Respiratory NADH Dehydrogenases Bioenergetics. In G. Schäfer, & H. Penefsky (Eds.), Vol. 45: 185-222: Springer Berlin / Heidelberg.
- Khan S. A., Carleton S. M., & P., N. R. 1981. Replication of plasmid pT181 DNA in vitro: requirement for a plasmid-encoded product. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 78(8): 4902 - 4906.
- Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L. 1992. Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. **Enzyme and Microbial Technology**, 14(8): 602-608.
- Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L. 1993. Biological conversion of coal and coal-derived synthesis gas. **Fuel**, 72(12): 1673-1678.
- Kofoed, E., Rappleye, C., Stojiljkovic, I., & Roth, J. 1999. The 17-Gene Ethanolamine (eut) Operon of *Salmonella typhimurium* Encodes Five Homologues of Carboxysome Shell Proteins. **J. Bacteriol.**, 181(17): 5317-5329.
- Koksharova, O., Schubert, M., Shestakov, S., & Cerff, R. 1998. Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Plant Molecular Biology**, 36(1): 183-194.
- Koo, M.-S., Lee, J.-H., Rah, S.-Y., Yeo, W.-S., Lee, J.-W., Lee, K.-L., Koh, Y.-S., Kang, S.-O., & Roe, J.-H. 2003. A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. **EMBO J**, 22(11): 2614-2622.
- Köpke, M. 2009a. Genetische Veränderung von *Clostridium ljungdahlii* zur Produktion von 1-Butanol aus Synthesegas. Universität Ulm.
- Köpke, M. 2009b. Genetische Veränderung von *Clostridium ljungdahlii* zur Produktion von 1-Butanol aus Synthesegas. Universität Ulm.
- Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., & Dürre, P. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107(29): 13087-13092.
- Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F. M., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J., Al-Sinawi, B., & Simpson, S. D. 2011. 2,3-Butanediol Production by Acetogenic Bacteria, an Alternative Route to Chemical Synthesis, Using Industrial Waste Gas. **Applied and Environmental Microbiology**, 77(15): 5467-5475.
- Krebs, W., Steuber, J., Gemperli, A. C., & Dimroth, P. 1999. Na<sup>+</sup> translocation by the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, 33(3): 590-598.

- Kristich, C. J., Manias, D. A., & Dunny, G. M. 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.
- Krulwich, T. A., Ito, M., & Guffanti, A. A. 2001. The Na<sup>+</sup>-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics***, 1505(1): 158-168.
- Lander E.S., Linton L.M., B., B., & authors, o. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. ***Nature***, 409(6822): 860-921.
- Leadbetter, J. R., Schmidt, T. M., Graber, J. R., & Breznak, J. A. 1999. Acetogenesis from H<sub>2</sub> Plus CO<sub>2</sub> by Spirochetes from Termite Guts. ***Science***, 283(5402): 686-689.
- Lederberg, E. M., & Cohen, S. N. 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by Plasmid Deoxyribonucleic Acid. ***Journal of Bacteriology***, 119(3): 1072-1074.
- Lepage, E., Brinster, S., Caron, C., Ducroix-Crepy, C., Rigottier-Gois, L., Dunny, G., Hennequet-Antier, C., & Serror, P. 2006. Comparative Genomic Hybridization Analysis of *Enterococcus faecalis*: Identification of Genes Absent from Food Strains. ***Journal of Bacteriology***, 188(19): 6858-6868.
- Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W., & Thauer, R. K. 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.
- Liou, J. S.-C., Balkwill, D. L., Drake, G. R., & Tanner, R. S. 2005. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 55(5): 2085-2091.
- Liu, X., Zhu, Y., & Yang, S.-T. 2006. Construction and Characterization of a Deleted Mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for Enhanced Butyric Acid and Hydrogen Production. ***Biotechnology Progress***, 22(5): 1265-1275.
- Liu, Y., Leal, N. A., Sampson, E. M., Johnson, C. L. V., Havemann, G. D., & Bobik, T. A. 2007. PduL Is an Evolutionarily Distinct Phosphotransacylase Involved in B12-Dependent 1,2-Propanediol Degradation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. ***Journal of Bacteriology***, 189(5): 1589-1596.
- Lorowitz, W. H., & Bryant, M. P. 1984. *Peptostreptococcus productus* strain that grows rapidly with CO as the energy source. ***Applied and Environmental Microbiology***, 47(5): 961-964.
- Lovell, C. R., Przybyla, A., & Ljungdahl, L. G. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Clostridium thermoaceticum* gene encoding thermostable formyltetrahydrofolate synthetase. ***Archives of Microbiology***, 149(4): 280-285.
- Lovell, C. R., Przybyla, A., & Ljungdahl, L. G. 1990. Primary structure of the thermostable formyltetrahydrofolate synthetase from *Clostridium thermoaceticum*. ***Biochemistry***, 29(24): 5687-5694.
- Lowe, T. M., & Eddy, S. R. 1997. tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. ***Nucleic Acids Research***, 25(5): 0955-0964.

- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., *et al.* 2004. ARB: a software environment for sequence data. ***Nucleic Acids Research***, 32(4): 1363-1371.
- M. Tech, & Merkl, R. 2003. Enhanced gene prediction obtained by a combination of existing methods. ***In Silico Biol***, 3: 441-451.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., DeWeese-Scott, C., Geer, L. Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., *et al.* 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. ***Nucleic Acids Research***, 33(suppl 1): D192-D196.
- Martin, W. F. 2012. Hydrogen, metals, bifurcating electrons, and proton gradients: The early evolution of biological energy conservation. ***FEBS Letters***, 586(5): 485-493.
- Mathiesen, C., & Hägerhäll, C. 2002. Transmembrane topology of the NuoL, M and N subunits of NADH:quinone oxidoreductase and their homologues among membrane-bound hydrogenases and bona fide antiporters. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics***, 1556(2-3): 121-132.
- McInerney, M. J., & Bryant, M. P. 1981. Anaerobic Degradation of Lactate by Syntrophic Associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* Species and Effect of H<sub>2</sub> on Acetate Degradation. ***Applied and Environmental Microbiology***, 41(2): 346-354.
- Mead, G. C. 1971. The Amino Acid-fermenting Clostridia. ***Journal of General Microbiology***, 67(1): 47-56.
- Meier, T., Ferguson, S. A., Cook, G. M., Dimroth, P., & Vonck, J. 2006. Structural Investigations of the Membrane-Embedded Rotor Ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum*. ***J. Bacteriol.***, 188(22): 7759-7764.
- Menon, S., & Ragsdale, S. W. 1996. Evidence That Carbon Monoxide Is an Obligatory Intermediate in Anaerobic Acetyl-CoA Synthesis. ***Biochemistry***, 35(37): 12119-12125.
- Mermelstein, L. D., Welker, N. E., Bennett, G. N., & Papoutsakis, E. T. 1992. Expression of Cloned Homologous Fermentative Genes in *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824. ***Nat Biotech***, 10(2): 190-195.
- Meyer, M., Granderath, K., & Andreesen, J. R. 1995. Purification and Characterization of Protein P<sub>B</sub> of Betaine Reductase and its Relationship to the Corresponding Proteins Glycine Reductase and Sarcosine Reductase from *Eubacterium Acidaminophilum*. ***European Journal of Biochemistry***, 234(1): 184-191.
- Mimitsuka, T., Sawai, H., Hatsu, M., & Yamada, K. 2007. Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Cadaverine Fermentation. ***Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry***, 71(9): 2130-2135.
- Mitchell, W. J. 1992. Carbohydrate assimilation by saccharolytic clostridia. ***Research in Microbiology***, 143(3): 245-250.
- Möller, B., Hippe, H., & Gottschalk, G. 1986. Degradation of various amine compounds by mesophilic clostridia. ***Archives of Microbiology***, 145(1): 85-90.
- Monod, M., Denoya, C., & Dubnau, D. 1986. Sequence and properties of pIM13, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance plasmid from *Bacillus subtilis*. ***Journal of Bacteriology***, 167(1): 138-147.



- Monot, M., Boursaux-Eude, C., Thibonnier, M., Vallenet, D., Moszer, I., Medigue, C., Martin-Verstraete, I., & Dupuy, B. 2011. Reannotation of the genome sequence of *Clostridium difficile* strain 630. **Journal of Medical Microbiology**, 60(8): 1193-1199.
- Morino, M., Natsui, S., Ono, T., Swartz, T. H., Krulwich, T. A., & Ito, M. 2010. Single Site Mutations in the Hetero-oligomeric Mrp Antiporter from Alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 That Affect Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport Activity, Sodium Exclusion, Individual Mrp Protein Levels, or Mrp Complex Formation. **Journal of Biological Chemistry**, 285(40): 30942-30950.
- Morrison, D. A. 1977. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. **Journal of Bacteriology**, 132(1): 349-351.
- Müller, V. 2003. Energy Conservation in Acetogenic Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69(11): 6345-6353.
- Müller, V., Aufurth, S., & Rahlfs, S. 2001. The Na<sup>+</sup> cycle in *Acetobacterium woodii*: identification and characterization of a Na<sup>+</sup> translocating F1F0-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1505(1): 108-120.
- Müller, V., Imkamp, F., Biegel, E., Schmidt, S., & Dilling, S. 2008. Discovery of a Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreductase (Rnf) in *Acetobacterium woodii*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1125(Incredible Anaerobes From Physiology to Genomics to Fuels): 137-146.
- Müller V., & Gottschalk, G. 1994. The sodium ion cycle in acetogenic and methanogenic bacteria: generation and utilization of a primary electrochemical sodium ion gradient. In Drake H.L. (Ed.), **Acetogenesis**: 127-156. New York, NY: Chapman & Hall.
- Naidu D., R. S. W. 2001. Characterization of a Three-Component Vanillate O-Demethylase from *Moorella thermoacetica*. **Journal of Bacteriology**, 183(11): 3276-3281.
- Najafpour, G., & Younesi, H. 2006. Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*. **Enzyme and Microbial Technology**, 38(1-2): 223-228.
- Nasri, M., & Thomas, D. 1986. Relaxation of recognition sequence of specific endonuclease HIndIII. **Nucleic Acids Research**, 14(2): 811-821.
- Nebel, U., & Kühnel, M. 2010. Survey of the different chicken housing systems and accumulating form of manure/slurry for the derivative of a standardised form of veterinary drug decomposition in expositions scenarios: Umweltbundesamt.
- Nisman, B. 1954. The Stickland Reaction. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 18(1): 16-42.
- Nolling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H. M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., et al. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. **J Bacteriol**, 183: 4823 - 4838.
- Novick, R. P. 1989. Staphylococcal Plasmids and their Replication. **Annual Review of Microbiology**, 43(1): 537-563.
- Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P. T., Figurski, D. H., Guiney, D. G., Haas, D., Helinski, D. R., Schwab, H., Stanisich, V. A., & Thomas, C. M. 1994. Complete Nucleotide Sequence of Birmingham IncPa Plasmids: Compilation and Comparative Analysis. **Journal of Molecular Biology**, 239(5): 623-663.

- Pearson, W. R., & Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 85(8): 2444-2448.
- Pellicic, V., Reytrat, J. M., & Gicquel, B. 1996. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on *mycobacteria*. ***Journal of Bacteriology***, 178(4): 1197-1199.
- Perutka, J., Wang, W., Goerlitz, D., & Lambowitz, A. M. 2004. Use of Computer-designed Group II Introns to Disrupt *Escherichia coli* DEXH/D-box Protein and DNA Helicase Genes. ***Journal of Molecular Biology***, 336(2): 421-439.
- Pezacka, E., & Wood, H. 1984a. The synthesis of acetyl-CoA by *Clostridium thermoaceticum* from carbon dioxide, hydrogen, coenzyme A and methyltetrahydrofolate. ***Archives of Microbiology***, 137(1): 63-69.
- Pezacka, E., & Wood, H. G. 1984b. Role of carbon monoxide dehydrogenase in the autotrophic pathway used by acetogenic bacteria. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 81(20): 6261-6265.
- Phillips, J., Clausen, E., & Gaddy, J. 1994. Synthesis gas as substrate for the biological production of fuels and chemicals. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, 45-46(1): 145-157.
- Pierce, E., Xie, G., Barabote, R. D., Saunders, E., Han, C. S., Detter, J. C., Richardson, P., Brettin, T. S., Das, A., Ljungdahl, L. G., & Ragsdale, S. W. 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). ***Environmental Microbiology***, 10(10): 2550-2573.
- Pierce E., X. G., Barabote R. D., Saunders E., Han C. S., Detter J. C., Richardson P., Brettin T. S., Das A., Ljungdahl L. G., Ragsdale S. W. 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). ***Environmental Microbiology***, 10(10): 2550-2573.
- Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Vollmers, J., Thürmer, A., Bertsch, J., Schuchmann, K., Voigt, B., Hecker, M., Daniel, R., Thauer, R. K., Gottschalk, G., & Müller, V. 2012. An Ancient Pathway Combining Carbon Dioxide Fixation with the Generation and Utilization of a Sodium Ion Gradient for ATP Synthesis. ***PLoS ONE***, 7(3): e33439.
- Purdy, D., Triona, A. T., O'Keeffe, M., Elmore, M. H., McLeod, A., Bokori-Brown, M., Ostrowski, A., & Minton, N. P. 2002. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. ***Molecular Microbiology***, 46(2): 439-452.
- Qiao, C., & Marsh, E. N. G. 2005. Mechanism of Benzylsuccinate Synthase: Stereochemistry of Toluene Addition to Fumarate and Maleate. ***Journal of the American Chemical Society***, 127(24): 8608-8609.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. ***Nucleic Acids Research***, 33(suppl 2): W116-W120.
- Rabinowitz, J. C. 1956. Purine Fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. ***Journal of Biological Chemistry***, 218(1): 175-187.
- Rabinowitz, J. C., & Barker, H. A. 1956a. Purine Fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. ***Journal of Biological Chemistry***, 218(1): 147-160.

- Rabinowitz, J. C., & Barker, H. A. 1956b. Purine Fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, 218(1): 161-173.
- Rabinowitz, J. C., & Pricer, W. E. 1956a. Purine Fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, 218(1): 189-199.
- Rabinowitz, J. C., & Pricer, W. E. 1956b. Purine Fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, 222(2): 537-554.
- Rachinger, M. 2010. **Stammdesign in *Bacillus licheniformis***. Unpublished Dissertation, Georg-August Universität Göttingen, Göttingen.
- Ragsdale, S. W. 2004. Life with Carbon Monoxide. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 39(3): 165 - 195.
- Ragsdale, S. W., & Kumar, M. 1996. Nickel-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase. **Chemical Reviews**, 96(7): 2515-2540.
- Ragsdale, S. W., Ljungdahl, L. G., & DerVartanian, D. V. 1983. Isolation of carbon monoxide dehydrogenase from *Acetobacterium woodii* and comparison of its properties with those of the *Clostridium thermoaceticum* enzyme. **Journal of Bacteriology**, 155(3): 1224-1237.
- Ragsdale, S. W., & Pierce, E. 2008. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, 1784(12): 1873-1898.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. 2006. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. **Food Technology and Biotechnology**, 44: 185-195.
- Raybuck Scott A., Bastian Neil R., Orme-Johnson William H., & T., W. C. 1988. Kinetic characterization of the carbon monoxide-acetyl-CoA (carbonyl group) exchange activity of the acetyl-CoA synthesizing carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. **Biochemistry**, 27(20): 7698-7702.
- Reidlinger, J., & Müller, V. 1994. Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na<sup>+</sup>-translocating F<sub>1</sub>FO-type enzyme. **European Journal of Biochemistry**, 223(1): 275-283.
- Reyrat, J.-M., Pelicic, V., Gicquel, B., & Rappuoli, R. 1998. Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis. **Infection and Immunity**, 66(9): 4011-4017.
- Richardson, D. J., Berks, B. C., Russell, D. A., Spiro, S., & Taylor, C. J. 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 58(2): 165-178.
- Roberts, D. L., James-Hagstrom, J. E., Garvin, D. K., Gorst, C. M., Runquist, J. A., Baur, J. R., Haase, F. C., & Ragsdale, S. W. 1989. Cloning and expression of the gene cluster encoding key proteins involved in acetyl-CoA synthesis in *Clostridium thermoaceticum*: CO dehydrogenase, the corrinoid/Fe-S protein, and methyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 86(1): 32-36.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.-A., & Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, 16(10): 944-945.

- Sambrook, J. 2001. ***Molecular Cloning: A Laboratory Manual***: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. ***Gene***, 145(1): 69-73.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. ***Annual Review of Plant Biology***, 61(1): 263-289.
- Schmehl, M., Jahn, A., Meyer zu Vilsendorf, A., Hennecke, S., Masepohl, B., Schuppler, M., Marxer, M., Oelze, J., & Klipp, W. 1993. Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. ***Molecular and General Genetics MGG***, 241(5): 602-615.
- Schmidt, S., Biegel, E., & Muller, V. 2009. The ins and outs of Na(+) bioenergetics in *Acetobacterium woodii*. ***Biochim Biophys Acta***, 1787: 691 - 696.
- Schuchmann, K., & Müller, V. 2012. A bacterial electron bifurcating hydrogenase. ***Journal of Biological Chemistry***.
- Schultz, J. E., & Matin, A. 1991. Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. ***Journal of Molecular Biology***, 218(1): 129-140.
- Schut, G. J., & Adams, M. W. W. 2009. The Iron-Hydrogenase of *Thermotoga maritima* Utilizes Ferredoxin and NADH Synergistically: a New Perspective on Anaerobic Hydrogen Production. ***Journal of Bacteriology***, 191(13): 4451-4457.
- Sebahia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N., Stabler, R., Thomson, N. R., Roberts, A. P., Cerdano-Tarraga, A. M., Wang, H., *et al.* 2006a. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. ***Nat Genet***, 38(7): 779-786.
- Sebahia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N. P., Stabler, R., Thomson, N. R., Roberts, A. P., Cerdano-Tarraga, A. M., Wang, H., *et al.* 2006b. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. ***Nat Genet***, 38(7): 779-786.
- Seedorf, H., Fricke, W. F., Veith, B., Brüggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeyer, C. H., Thauer, R. K., & Gottschalk, G. 2008. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 105(6): 2128-2133.
- Seifritz, C., Daniel, S. L., Gössner, A., & Drake, H. L. 1993. Nitrate as a preferred electron sink for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. ***Journal of Bacteriology***, 175(24): 8008-8013.
- Seki, Y., Seki, S., Satoh, M., Ikeda, A., & Ishimoto, M. 1989. Rubredoxin from *Clostridium perfringens*: Complete Amino Acid Sequence and Participation in Nitrate Reduction. ***Journal of Biochemistry***, 106(2): 336-341.
- Selmer, T., Pierik Antonio, J., & Heider, J. 2005. New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria, ***Biological Chemistry***, Vol. 386: 981.
- Seravalli, J., Kumar, M., Lu, W.-P., & Ragsdale, S. W. 1997. Mechanism of Carbon Monoxide Oxidation by the Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase

- from *Clostridium thermoaceticum*: Kinetic Characterization of the Intermediates. **Biochemistry**, 36(37): 11241-11251.
- Seravalli, J., Shoemaker, R. K., Sudbeck, M. J., & Ragsdale, S. W. 1999a. Binding of (6R,S)-Methyltetrahydrofolate to Methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: Role of Protonation of Methyltetrahydrofolate in the Mechanism of Methyl Transfer. **Biochemistry**, 38(18): 5736-5745.
- Seravalli, J., Zhao, S., & Ragsdale, S. W. 1999b. Mechanism of Transfer of the Methyl Group from (6S)-Methyltetrahydrofolate to the Corrinoid/Iron-Sulfur Protein Catalyzed by the Methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: A Key Step in the Wood-Ljungdahl Pathway of Acetyl-CoA Synthesis. **Biochemistry**, 38(18): 5728-5735.
- Shalon D., Smith S J., & Brown P O. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. **Genome Research**, 6(7): 639-645.
- Simon, R., Priefer, U., & Puhler, A. 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Nat Biotech**, 1(9): 784-791.
- Smith, K., Klasson, K., Clausen, A., & Gaddy, J. 1991. Cos degradation by selected co-utilizing bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 28-29(1): 787-796.
- Song, Y. L., Liu, C. X., McTeague, M., Summanen, P., & Finegold, S. M. 2004. *Clostridium bartlettii* sp. nov., isolated from human faeces. **Anaerobe**, 10(3): 179-184.
- Soucaille, P., & Papoutsakis, E. T. unpublished work.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, 98(3): 503-517.
- Steuber, J. 2001. Na<sup>+</sup> translocation by bacterial NADH:quinone oxidoreductases: an extension to the complex-I family of primary redox pumps. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1505(1): 45-56.
- Stickland, L. H. 1934. Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): The chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy. **Biochem J**, 28: 1746 - 1759.
- Stolpe, S., & Friedrich, T. 2004. The *Escherichia coli* NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) Is a Primary Proton Pump but May Be Capable of Secondary Sodium Antiport. **Journal of Biological Chemistry**, 279(18): 18377-18383.
- Stratz, M., Sauer, U., Kuhn, A., & Dürre, P. 1994. Plasmid Transfer into the Homoacetogen *Acetobacterium woodii* by Electroporation and Conjugation. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60(3): 1033-1037.
- Swinfield, T.-J., Janni re, L., Ehrlich, S. D., & Minton, N. P. 1991. Characterization of a region of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAM 1 which enhances the segregational stability of pAM 1-derived cloning vectors in *Bacillus subtilis*. **Plasmid**, 26(3): 209-221.
- Talaat, A. M., Howard, S. T., Hale IV, W., Lyons, R., Garner, H., & Johnston, S. A. 2002. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nucleic Acids Research**, 30(20): e104.

- Tanner, R. S., & Laopaiboon, R. 1997. Metabolism of *Clostridium ljungdahlii*, an acetogen in the clostridial RNA homology group I. **BioFactors**, 6(1): 53-81.
- Tanner, R. S., Miller, L. M., & Yang, D. 1993. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. **Int J Syst Bacteriol**, 43(2): 232-236.
- Thauer, R. K. 2011. A novel mechanism of energetic coupling in anaerobes. **Environmental Microbiology Reports**, 3(1): 24-25.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. **Bacteriological Reviews**, 41(1): 100-180.
- Thoenes, U., Flores, O. L., Neves, A., Devreese, B., Van Beeumen, J. J., Huber, R., Romao, M. J., LeGall, J., Moura, J. J. G., & Rodrigues-Pousada, C. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of the gene of the molybdenum-containing aldehyde oxidoreductase of *Desulfovibrio gigas*. **European Journal of Biochemistry**, 220(3): 901-910.
- Tokuda, H., & Unemoto, T. 1984. Na<sup>+</sup> is translocated at NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. **J. Biol. Chem.**, 259(12): 7785-7790.
- Tripathi, S. A., Olson, D. G., Argyros, D. A., Miller, B. B., Barrett, T. F., Murphy, D. M., McCool, J. D., Warner, A. K., Rajgarhia, V. B., Lynd, L. R., Hogsett, D. A., & Caiazza, N. C. 2010. Development of *pyrF*-Based Genetic System for Targeted Gene Deletion in *Clostridium thermocellum* and Creation of a *pta* Mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, 76(19): 6591-6599.
- Tummala, S. B., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. 1999. Development and Characterization of a Gene Expression Reporter System for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(9): 3793-3799.
- Ukpong, M. N., Atiyeh, H. K., De Lorme, M. J. M., Liu, K., Zhu, X., Tanner, R. S., Wilkins, M. R., & Stevenson, B. S. 2012. Physiological response of *Clostridium carboxidivorans* during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**: n/a-n/a.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* 2001. The Sequence of the Human Genome. **Science**, 291(5507): 1304-1351.
- Verkhovskiy, M. I., & Bogachev, A. V. 2010. Sodium-translocating NADH:quinone oxidoreductase as a redox-driven ion pump. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1797(6-7): 738-746.
- Vieira, J., & Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene**, 19(3): 259-268.
- Walter, D., Ailion, M., & Roth, J. 1997. Genetic characterization of the pdu operon: use of 1,2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, 179(4): 1013-1022.
- Wang, S., Huang, H., Moll, J., & Thauer, R. K. 2010. NADP<sup>+</sup> Reduction with Reduced Ferredoxin and NADP<sup>+</sup> Reduction with NADH Are Coupled via an Electron-Bifurcating Enzyme Complex in *Clostridium kluyveri*. **Journal of Bacteriology**, 192(19): 5115-5123.

- Weißermel, K., & Arpe, H.-J. 2003. **Industrial organic chemistry** (4<sup>th</sup> ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Wiegel, J., Braun, M., & Gottschalk, G. 1981. *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. **Current Microbiology**, 5(4): 255-260.
- Wiemann, K. 2005. **Beitrag zur Geschichte der Ernährungsforschung beim Haushuhn (bis 1950)**. Unpublished Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Wieringa, K. 1939. The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 6(1): 251-262.
- Wirt, M. D., Kumar, M., Wu, J.-j., Scheuring, E. M., Ragsdale, S. W., & Chance, M. R. 1995. Structural and Electronic Factors in Heterolytic Cleavage: Formation of the Co(I) Intermediate in the Corrinoid/Iron-Sulfur Protein from *Clostridium thermoaceticum*. **Biochemistry**, 34(15): 5269-5273.
- Wolin, E. A., Wolin, M. J., & Wolfe, R. S. 1963. Formation of Methane by Bacterial Extracts. **Journal of Biological Chemistry**, 238(8): 2882-2886.
- Wollherr, A. 2010. **Komparative Genomanalyse zur Stammoptimierung produktionsnaher Bacillus-Stämme**. Unpublished Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Wood, H. G., & Ljungdahl, L. G. 1991. Autotrophic character of the acetogenic bacteria. In J. M. Shively, & L. L. Barton (Eds.), **Variations in Autotrophic Life**: 201-250. San Diego CA: Academic Press.
- Yamamoto, I., Saiki, T., Liu, S. M., & Ljungdahl, L. G. 1983. Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. **Journal of Biological Chemistry**, 258(3): 1826-1832.
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., et al. 2008. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105(21): 7564-7569.
- Yang, H., & HL, D. 1990. Differential effects of sodium on hydrogen-and glucose-dependent growth of the acetogenic bacterium *Acetogenium kivui*. **Appl Environ Microbiol**, 56(1): 81-92.
- Yang, S.-S., Ljungdahl, L. G., Dervartanian, D. V., & Watt, G. D. 1980. Isolation and characterization of two rubredoxins from *Clostridium thermoaceticum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 590(1): 24-33.
- Ye, Q., Roh, Y., Carroll, S. L., Blair, B., Zhou, J., Zhang, C. L., & Fields, M. W. 2004. Alkaline Anaerobic Respiration: Isolation and Characterization of a Novel Alkaliphilic and Metal-Reducing Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, 70(9): 5595-5602.
- Yeates, T. O., Kerfeld, C. A., Heinhorst, S., Cannon, G. C., & Shively, J. M. 2008. Protein-based organelles in bacteria: carboxysomes and related microcompartments. **Nat Rev Micro**, 6(9): 681-691.
- Younesi, H., Najafpour, G., & Mohamed, A. R. 2005. Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. **Biochemical Engineering Journal**, 27(2): 110-119.

- Youngleson, J. S., Jones, W. A., Jones, D. T., & Woods, D. R. 1989. Molecular analysis and nucleotide sequence of the *adh1* gene encoding an NADPH-dependent butanol dehydrogenase in the Gram-positive anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. **Gene**, 78(2): 355-364.
- Youngleson, J. S., Santangelo, J. D., Jones, D. T., & Woods, D. R. 1988. Cloning and Expression of a *Clostridium acetobutylicum* Alcohol Dehydrogenase Gene in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 54(3): 676-682.
- Yu, L., Blaser, M., Andrei, P. I., Pierik, A. J., & Selmer, T. 2006. 4-Hydroxyphenylacetate Decarboxylases: Properties of a Novel Subclass of Glycyl Radical Enzyme Systems. **Biochemistry**, 45(31): 9584-9592.
- Yu, M., Du, Y., Jiang, W., Chang, W.-L., Yang, S.-T., & Tang, I. C. 2012. Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and n-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 93(2): 881-889.
- Zhong, J., Karberg, M., & Lambowitz, A. M. 2003. Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. **Nucleic Acids Research**, 31(6): 1656-1664.
- Zhu, Y., Liu, X., & Yang, S.-T. 2005. Construction and characterization of pta gene-deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, 90(2): 154-166.



## 7. Anhang

Tab. 47: Übersicht über die verwendeten Primer

<b>Primer für real-time</b>	
RT_acsA_rev	TCCAAGATTTGCCTCTGTAT
RT_acsA_fwd	TAGCTGGAGTTATGCATTCA
RT_metF_rev	CTTGAAGCTCTAACGGATCAT
RT_metF_fwd	TGGTGCAAAGCCAGTTTAT
RT_CODHM_rev	CAAGACCTGCACCAAGTATTA
RT_CODHM_fwd	AAGACAACAGCAGCTTCAA
RT_Betain_red_re	GATTCAAGCCATATCTGATGTC
RT_Betain_red_fw	ATCCTGGAGTTGAGATGTTT
RT_Sec_transf_re	GCTCCACTAAAGCTCATAACA
RT_Sec_transf_fw	TATAGCCACGTTGAAGAACTC
RT_adh1_rev	CGTGAGTAAGTGCATCCATT
RT_adh1_fwd	GTGGAACAGCAACTGAAGTA
RT_ruvB_rev	GTGAATTTAGGTAGGTCCAATC
RT_ruvB_fwd	GCTGCAATACTTACCAGTTT
RT_DNAbind_rev	GGAAGTGTGATTCAGGTATT
RT_DNAbind_fwd	GCAGCTCTTAAAGGGTTTATAG
RT_mutS_rev	TATTTGATCCCGTGATAAGTG
RT_mutS_fwd	CTTGCAGTTATAGCATTTGAC
RT-aor_fwd	GATGGCAGATGGTTCATAC
RT-aor_rev	CCACTGCAAGTCTATCAAG
RT-adh2_fwd	GAGATTCGGTTTCCTTGAC
RT-adh2_rev	GCCACATAGCCTTTGC
RT-pyk_fwd	GCCAGGATGTCATGTTATAG
RT-pyk_rev	ACCTGCTGCTATGATTACC
RT-PTS_fwd	TGGACTACCTGCTTCAC
RT-PTS_rev	GGACCTCCCATATCTACAG
RT-gap_fwd	ACAGGTTGTAGGTATCAATG
RT-gap_rev	TTCAGCACCTAATGAATTCC
<b>Bestimmung der mRNA von rnf-Operon</b>	
rnf_fwd_58	GAGTAAAAAGCCAGTAATCAC
rnfC_fwd_558	ATTACCCACATCCTGGTTT
rnfC_rev_1504	CTCTTCCTTAGCCTCTTGATA
rnfD_rev_2375	CTGGAATCTGCCAGTTAAT
rnfG_rev_3060	CCCGGAGTTTCATTATGAGA
rnfE_rev_3315	TATGGGGTTTTCTGCAATC
rnfE_rev_3796	CTCCAGGTGGAAGTATCAT
rnfD_fwd_1791	GTGTCTGTTTAGCACTAACTC
rnfG_fwd_2683	GACAAGGAGGTAAGCTTTAAT
rnfA_rev_4394	AGGTACATCTGCTAATCTCA
rnfE_fwd_3299	TTGCAGAAAACCCCATATTC
rnfB_rev_5288	AATAGCTCCTGTAGGACATT

## Anhang

---

mfE_fwd_3884	CAAATGGAGGTGAAGCATAA
mfA_fwd_3904	TGGCATCTTACCTTACTCTT
RT_rnf_rev_end	ACCGGTGCTTTTAATCTCT
RT_rnfB_fwd	AATGTTAGCTCTGGCTTTC
rnfC_+29_rev	AATGCCTGCCTCTCTTATTAT
RT_rnf_-987	TCGGAGGGTATTGTAATTGAA
RT_reg_fwd_205	ACGGCTTGAAATCAATAGT
RT_reg_rev_913	GATTCCAATAAGCGGTAGTA

---

### RACE

RACE mf 807rev	GGTTCACACTCAGCACCATT
RACE mf 712rev	TCCTACAATGCCTGCCTCTC
RACE reg outer	ACAATAAAGGCTGCCATAAC
RACE reg inner	AGGACAAGCACCACAAC
RACE reg fwd	CGC TAA CAA ATA ATA GGA GGT GTA
RACE Outer Primer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTTGCTGGCTTTGATG

---

### check-Primer für RNA-Isolierung

atpB_fwd	AATACATCTGGGAGCATTTC
atpB_rev	CCATGCCATACTACCTAATC
atpF_rev	AGTGCTAAATCTACCACTTG

---

### Stammüberprüfung

CA_levansucrase_fwd	CAGCAAAGGGTTATGATAAG
CA_levansucrase_rev	GTTTGTATGGACCAGTCAAG
CL_CODH_cooxI_fw d	AGAAGCTATGCAGGGAAATC
CL_CODH_cooxI_rev	GAGCCATTGCTGTATATGAC
16S-08fwd	AGAGTTTGATCCTGGC
16S1504-rev	TACCTTGTTACGACTT

---

### Klonierungen

pIMP1_fwd-check	GCTCTCAGAGGCTCATAGAC
pIMP1_rev_check	TGCCACCTGACGTCTAAGAA
pUC19_fwd	TTATGCTTCCGGCTCGTA
pUC19_rev	AAAGGCCAGGAACCGTAA
pIM13_rev	ACCTGCACGCTTATGTGAA
pIM13_fwd	TAAACCGTGTGCTCTACGA
pCH1_check_rev	CGGGCCTCTTCGCTATTA
pChsacB_check_fwd	AGTTGCGCAGCCTGAAT
prnf_rev_HindIII	AGCGTTTTACGAGGTTTAAAC
prnf_fwd_PscI	GAAGGTAATACTGTTCAATATCGATACAG
sacB_SOS_fwd	ACTA GGATCC GTAAAGTGCATTTTAAATTGGTTCC
sacB_SOS_rev	TACT GAATTC TTCTCTTCAACTTAATGCATTCC
sacB_fwd_NarI	GGAAGAAGCAGACCGCTAA
sacB_rev_NdeI	ATCTCGTGATGGCAGGTTG
sacB_pK19_fwd	GTT CGC TAG AGG ATC GAT CCT
sacB_pK19_rev	CAA TCA GCG GTT TCA TCA CT
sacB_pK19_fwd_2	GGAAGAAGCAGACCGCTAA
sacB_pK19_rev_2	ATCTCGTGATGGCAGGTTG

catP_MTL007__PscI_	
fwd	TC GGC AAG TGT TCA AGA AG
catP_MTL007_PscI_	
rev	TCT TTG TAC TAA CCT GTG GT

**Hybridisierung**

pCH1_rep_F1	GGGAGGTCAATCTATGAAATG
pCH1_rep_F2	TAGGACAAATCCGGGAGGTCAATCTATGAAATG
pCH1_rep_R1	AAGCGTCGGAGCATATC
pCH1_rep_R2	GGATTTGTCCTAAAGCGTCGGAGCATATC
pCH1_rep_R2N	GTACTTTAAACCAAGCGTCGGAGCATATC
pCH1_rep_F2N	GGATTTGTCCTAGGGAGGTCAATCTATGAAATG
pIP404_Hyb_F1	AGTTTTCGCCCCGAAG
pIP404_Hyb_F2	TAGGACAAATCCAGTTTTTCGCCCCGAAG
pIP404_Hyb_R1	TTACTTCAACGGCTTTATTATATG
pIP404_Hyb_R2	GTACTTTAAACCTTACTTCAACGGCTTTATTATATG
pAMalpha_H_R1	AGGGTTAATGATACGCTTCC
pAMalpha_H_R2	GTACTTTAAACCAGGGTTAATGATACGCTTCC
pAMalpha_H_F1	GGTGCGTTGAAGTGTTG
pAMalpha_H_F2	TAGGACAAATCCGGTGCGTTGAAGTGTTG
pT181_Hyb_F1	AGGTTCCGACCAATAAGG
pT181_Hyb_F2	GTACTTTAAACCAGGTTCCGACCAATAAGG
pT181_Hyb_R1	TCTTTACTTGAGGTGACTAAAG
pT181_Hyb_R2	TAGGACAAATCCTCTTTACTTGAGGTGACTAAAG
pta_fwd1	ATTTAACACAAAATTACACACAC
pta_fwd2	TTCTCCCTTTAA-ATTTAACAC
pta_rev1	AATGCCTAAGTGAAATATATACAT
pta_rev2	GGCGTGCTGCTAT-AATGCCTAAGTGAAATATATACAT
RAM prom rev	ATGGCATTATGTTTCAGATAAGG
RAM prom rev 2	GGAGGTGTATTTA-ATGGCATTATGTTTCAGATAAGG
RAM prom fwd	TAACGCGTTGGGAAAT
RAMpromF_1	AATGGCAATGATAGCGA
RAM prom fwd 2	CGATATTGAACAG-TAACGCGTTGGGAAAT
RAMpromF_2	TAACGCGTTGGGA-AATGGCAATGATAGCGA
ltrA prom fwd	TAGCAGCACGCCATAG
ltrA_promF_1	ATAGTGACTGGCGATG
ltrA prom fwd 2	GTATAATCTTGGA-TAGCAGCACGCCATAG
ltrA_promF_2	ATAGCAGCACGCC-ATAGTGACTGGCGATG
ltrA prom rev	ATGAAACCAACAATGGCA
ltrA_promR1	ATGGCAATTTTAGAAAGAATC
ltrA prom rev 2	GGGAATTATTAAT-ATGAAACCAACAATGGCAA
ltrA_promR2	TATGAAACCAACA-ATGGCAATTTTAGAAAGAATC
ltrAprompta_rev2	TTAAAGGGAGGAA-ATGAAACCAACAATGGCA
pltrA_check_fwd	CTCCCTACTTCACCATATC
pltrA_check_rev	TGATACGCCACGTAATAAAT
pRAM_check_fwd	ATAGTCTGCTCTGCATGG
pRAM_check_rev	TATCATTGCCATTTCCCAAC
ltrA_Hyb1_F	GAACAAGGCGGTACCTC
ltrA_Hyb2_F	GAGCTCGATATC-GAACAAGGCGGTACCTC

## Anhang

---

ltrA_Hyb_R1	GGCGGATTTGTCCTACTC
ltrA_Hyb_R2	GATATCGAGCTC-GGCGGATTTGTCCTACTC
pCH3_Hyb_F1	GTGCGTTGAAGTGTTGG
pCH3_Hyb_F2	GAGCTCGATATC-GTGCGTTGAAGTGTTGG
pCH3_Hyb_R1	GAAATGTGCGCGGAAC
pCH3_Hyb_R2	GATATCGAGCTC-GAAATGTGCGCGGAAC
pCH3dso_Hyb_F1	TCGAGATCAGGGAATGAG
pCH3dso_Hyb_F2	GAGCTCGATATC-TCGAGATCAGGGAATGAG
Intron_rev1	CCGCACAGATGCGTAA
Intron_rev2	GCGGTGTGAAATACCG
Intron_fwd1	GGAAAAACGCCAGCAAC
Intron_fwd2	TTTTGCGTAATAA-GGAAAAACGCCAGCAAC
pCHltrA_fwd1	GCGGTATCAGCTCACTC
pCHltrA_fwd2	TATTTACACCGC-GCGGTATCAGCTCACTC
pCHltrA_rev1	TGGCCCGATTTAAGCAC
pCHltrA_rev2	TTATTACGCAAAATGGCCC
pCH3ltrA_MO_F1	TCTGTTTCAGCAATCGGG
pCH3ltrA_MO_F2	TATTTACACCGC-TCTGTTTCAGCAATCGGG
IntronII_Hyb1_F	CGCTAAGCTTATAATTATCCTTAC
IntronII_Hyb2_F	TTAAAGGGAGGAA-CGCTAAGCTTATAATTATCCTTAC
IntronII_Hyb1_R	GCAAAAGGCCAGGAAC
IntronII_Hyb2_R	ATAGCAGCACGCC-GCAAAAGGCCAGGAAC
rnf prom fwd	CTGTTCAATATCGATACAGATA
rnf prom fwd 2	TCCAACGCGTTA-CTGTTCAATATCGATACAGATA
rnf prom rev	CGAGGTTTAAACTTAAATTACT
rnf prom rev 2	TAAATACACCTCC-CGAGGTTTAAACTTAAATTACT
repL Hyb F1	AATGCCGAGCGAAAGC
repL Hyb F2	TAGGACAAATCCAATGCCGAGCGAAAGC
repL Hyb R1	TGCACGCTTATGTGAATTAG
repL Hyb R2	GTACTIONTAAACCTGCACGCTTA
pCH5 Hyb F1	GGCCAGTTTGTGTTGAAGATTAG
pCH5 Hyb F2	GGTTTAAAGTACGGCCAGTTTGTGTTGAAGATTAG
pCH5 Hyb R1	CTCAGGAGAGCGTTCAC
pCH5 Hyb R2	GGATTTGTCTACTCAGGAG
CH5_I_check_fwd	GAACGATGACCTCTAATAATTG
CH5_I_check_rev	TACCGAAAGCCAGACTC

---

### ClosTron

EBS universal	CGAAATTAGAACTTGC GTTCAGTAAAC AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGAATTCGAAACTGTGCGCCCAGATAGGG TG
Betred_616S_IBS	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGAAACTGATAACTTACC TTTCTTTGT
Betred_616S_EBS1	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTAATTCTCGATAGAGGAAAGTGTCT AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAACATTCTTTCCAGTGCGCCAGATAGGGT G
bet-246S_IBS	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTTTCCAGGTA ACTTACC TTTCTTTGT
bet-246S_EBS1d	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTAATGTTTCGATAGAGGAAAGTGTCT
bet-246S_EBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACAAATCATTATGGTGCGCCAGATAGGG
rnfC_574S_IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACAAATCATTATGGTGCGCCAGATAGGG

---

	TG
rnfC_574S_EBS1	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCATTATGAATAACTTACC TTTCTTTGT
rnfC_574S_EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTATTTGTTCGATAGAGGAAAGTGTCT AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAAAGCCATAGAAGTGCGCCCAGATAGGG
rnfC-283S-IBS	TG
rnfC-283S-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCATAGAAGCTAACTTACC TTTCTTTGT
rnfC-283S-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGCTTTCCGATAGAGGAAAGTGTCT AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATCCATCGGGTCAGTGCGCCCAGATAGGG
35630-IBS	TG
35630-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGGGTCAGATAACTTACC TTTCTTTGT
35630-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTATGGATCGATAGAGGAAAGTGTCT
B246 check fwd	AATTGTAAAGCCTGGAGAC
B246 check rev	ACCGTCATATCTATTAATCC
B616 check fwd	ATGGGCAGATGCAGAAG
B616 check rev	TTGTTGCAGATGCAGATTG

**Tab. 48: Gene der Biosynthese von Vitaminen und Cofaktoren in *C. ljungdahlii*.** In *C. ljungdahlii* identifizierte Gene zur Biosynthese von Riboflavin, Thiamin, NAD<sup>+</sup>, CoA, Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub>

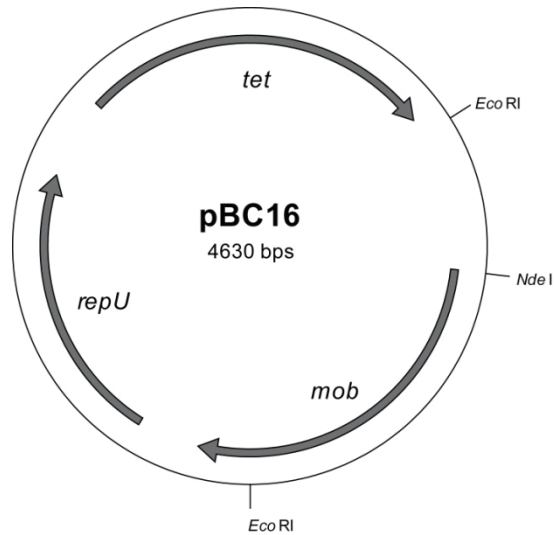
Gennummer	ORF	mögliche Funktion
<b>Riboflavinbiosynthese</b>		
CLJU_c13190	<i>ribF</i>	bifunktionale FAD-Synthetase /Riboflavin-Kinase
CLJU_c22060	<i>ribH</i>	Riboflavin-Synthase β Untereinheit
CLJU_c22070	<i>ribAB</i>	Riboflavinbiosyntheseprotein
CLJU_c22080	<i>ribE</i>	Riboflavin-Synthase α Untereinheit
CLJU_c22090	<i>ribD</i>	Riboflavinbiosyntheseprotein RibD
<b>Thiaminbiosynthese</b>		
CLJU_c12650		Thiamin-Pyrophospho-Kinase
CLJU_c13440	<i>thiE1</i>	Thiaminphosphate-Pyrophosphorylase
CLJU_c28350	<i>thiI</i>	mögliches Thiaminbiosyntheseprotein
CLJU_c33040	<i>thiD</i>	Phosphomethylpyrimidin-Kinase
CLJU_c33050	<i>thiM</i>	Hydroxyethylthiazole-Kinase
CLJU_c33060	<i>thiE2</i>	Thiaminphosphate-Pyrophosphorylase
CLJU_c35060		Hydroxyethylthiazole-Kinase
CLJU_c35510		mögliches Thiaminbiosyntheseprotein
<b>Nicotinat und Nicotinamid Metabolismus</b>		
CLJU_c00910		NADH-Pyrophosphatase
CLJU_c06920	<i>nadE</i>	Glutamin-abhängige NAD <sup>+</sup> -Synthetase
CLJU_c07400	<i>nadD</i>	Nicotinatnukleotid-Adenylyltransferase
CLJU_c11180	<i>ppnK</i>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Kinase
CLJU_c13430		Nicotinatphosphoribosyl-Transferase
CLJU_c19510		mögliche Pyrophosphohydrolase
CLJU_c20750	<i>punA</i>	Purinnukleosid-Phosphorylase
CLJU_c23150		Nicotin-Amidase
CLJU_c24410	<i>nadC</i>	Nicotinatnukleotid-Pyrophosphorylase
CLJU_c24420	<i>nadB</i>	L-Aspartat-Oxidase
CLJU_c24430	<i>nadA</i>	mögliche Quinolinat-Synthetase A
CLJU_c34740	<i>surE</i>	5'-Nukleotidase
<b>Pantothenat- und CoA-Biosynthese</b>		
CLJU_c03000	<i>acpS</i>	Phosphopantetheinyl-Transferase
CLJU_c08720		2-Dehydropantoat-2-reduktase
CLJU_c12540	<i>coaBC</i>	Phosphopantothenoylcystein-Synthase/Decarboxylase
CLJU_c12720	<i>coaD</i>	Phosphopantethein-Adenylyltransferase
CLJU_c17690	<i>panE</i>	Ketopantoat-Reductase
CLJU_c20360		2-Dehydropantoat-2-reduktase
CLJU_c21330		Cytidylat-Kinase
CLJU_c33600	<i>coaE</i>	Dephospho-CoA-Kinase
CLJU_c41520		Typ III Pantothenat-Kinase
<b>Folatbiosynthese</b>		
CLJU_c04020		6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase
CLJU_c06340	<i>folP</i>	Dihydropteroat-Synthase
CLJU_c06350	<i>folE</i>	GTP Cyclohydrolase I
CLJU_c06370		Bifunktionales Folatsyntheseprotein
CLJU_c24490	<i>dfrD</i>	Dihydrofolat-Reduktase
CLJU_c34680	<i>folC</i>	Folylpolyglutamat-Synthase
CLJU_c36000		4-Amino-4-Deoxychorismat-Lyase
CLJU_c36010		Para-Aminobenzoat-Synthase Komponente I
CLJU_c36020		Para-Aminobenzoat-Synthase Komponente II

Gennummer	ORF	mögliche Funktion
<b>B12 Biosynthese</b>		
CLJU_c04480	<i>hemA</i>	Glutamyl-tRNA Reduktase
CLJU_c04490	<i>hemL</i>	Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Amino-Mutase
CLJU_c07950	<i>hemN</i>	Sauerstoff-unabhängige Co-Proporphyrinogen-III-Oxidase
CLJU_c19100	<i>hemE</i>	Uroporphyrinogen-Decarboxylase
CLJU_c31820	<i>cobO</i>	Cob(I)yrinic acid a,c-Diamid-Adenosyl-Transferase
CLJU_c31840	<i>cibJ</i>	Cobalt-precorrin-6A-Reduktase
CLJU_c31850	<i>cibK</i>	Sirohydrochlorin-Cobalto-Chelatase
CLJU_c31860	<i>cibH</i>	Cobalt-Precorrin-3B-C(17)-Methyltransferase
CLJU_c31870	<i>cibG</i>	Cobalaminbiosyntheseprotein CbiG
CLJU_c31880	<i>cibF</i>	Cobalt-Precorrin-4-C(11)-Methyltransferase
CLJU_c31890	<i>cibL</i>	Cobalt-Precorrin-2-C(20)-Methyltransferase
CLJU_c31900	<i>cibT</i>	Cobalt-Precorrin-6Y-C(15)-Methyltransferase
CLJU_c31910	<i>cibE</i>	Cobalt-Precorrin-6Y-C(5)-Methyltransferase
CLJU_c31920	<i>cibD</i>	Cobalt-Precorrin-6A-Synthase
CLJU_c31930	<i>cibC</i>	Cobalt-Precorrin-8X-Methyl-Mutase
CLJU_c31940	<i>cobT</i>	Nicotinatnukleotid-Dimethylbenzimidazol-Phosphoribosyl-Transferase
CLJU_c31950	<i>cibA</i>	Cobyric acid-A,C-Diamid-Synthase CbiA
CLJU_c31960	<i>hemB</i>	$\delta$ -Aminolevulinat-Dehydratase
CLJU_c31970	<i>hemD</i>	Porphyrinbiosyntheseprotein
CLJU_c31970	<i>hemD</i>	Porphyrinbiosyntheseprotein
CLJU_c31980	<i>hemC</i>	Porphobilinogen-Deaminase
CLJU_c31990	<i>sirC</i>	Precorrin-2-Dehydrogenase
CLJU_c32000	<i>cobD1</i>	Threonin-Phosphat-Decarboxylase
CLJU_c32010	<i>cobD2</i>	Cobalaminbiosyntheseprotein CobD
CLJU_c32020	<i>cobQ</i>	Cobyric acid-Synthase
CLJU_c35520	<i>cobU</i>	bifunktionale Adenosylcobalaminbiosyntheseprotein CobU
CLJU_c35530	<i>cobS</i>	Cobalamin-Synthase
CLJU_c35540	<i>cobC</i>	$\alpha$ -Ribazol-Phosphatase

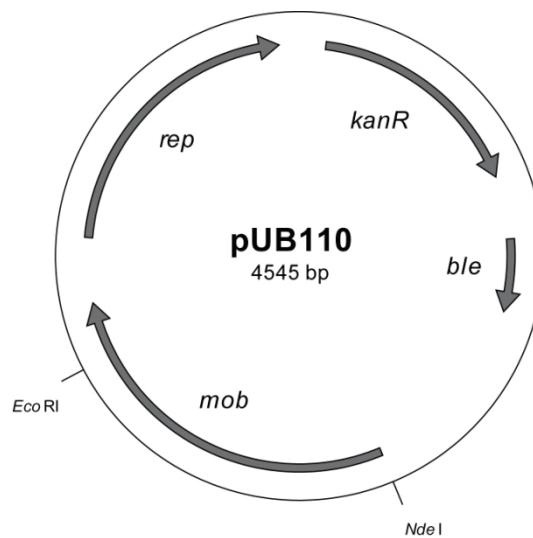
**Tab. 49: Schema der verwendeten Primer zur Amplifikation der rnf-Gene zur Aufklärung der Operonstruktur.** Die Produkte sind analog Abb. 46 nummeriert

Produkt (analog Abb. 46)	Primer forward	Primer reverse
1	RT_reg_fwd_205	RT_reg_rev_913
2	RT_rnf_-987	rnfC_+29_rev
3	rnf_fwd_58	rnfC_rev_1504
4	rnfC_fwd_558	rnfD_rev_2375
5	rnfD_fwd_1791	rnfE_rev_3796
6	rnfG_fwd_2683	rnfA_rev_4394
7	rnfE_fwd_3299	rnfB_rev_5288
8	rnfA_fwd_3904	RT_rnf_end

**Plasmidkarten:**

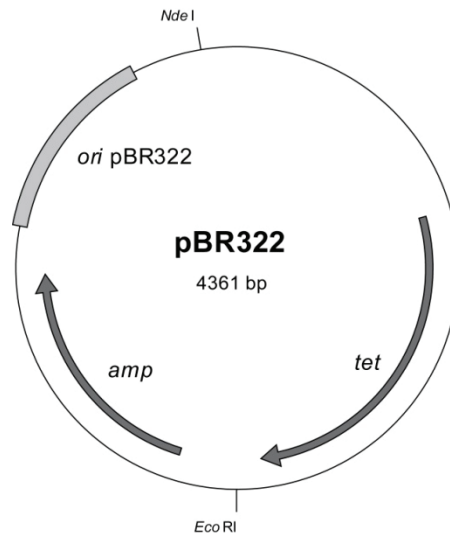


**Abb. 52: Plasmidkarte von pBC16 aus *B. subtilis*:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *repU*: Gram-positives Replikationsprotein, *tet*: Tetracyclin-Resistenzgen, *mob*: Gram-positives Mobilitätsprotein für Konjugation.

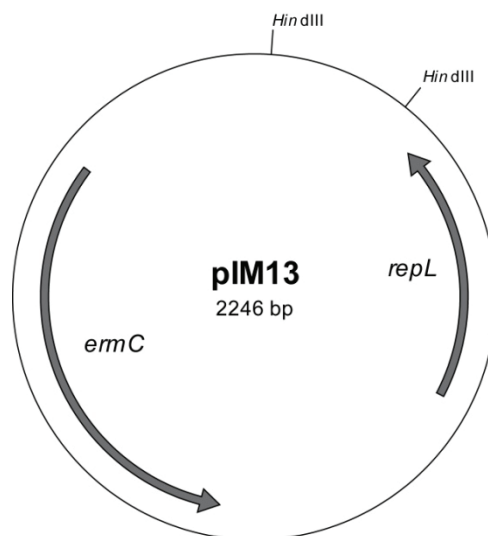


**Abb. 53: Plasmidkarte von pUB110 aus *B. subtilis*:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *rep*: Gram-positives Replikationsprotein, *kanR*: Kanamycin-Resistenzgen, *ble*: Bleomycin-Resistenzgen, *mob*: Gram-positives Mobilitätsprotein für Konjugation.

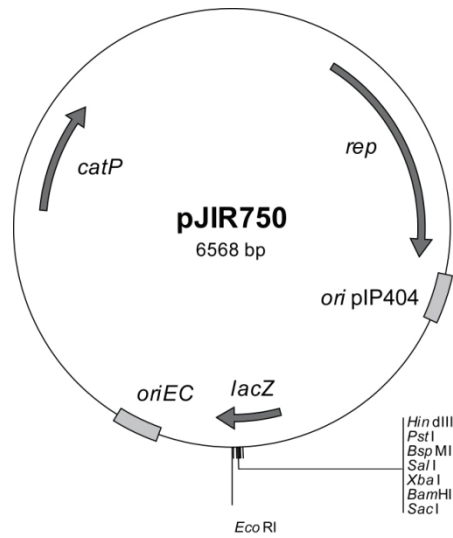




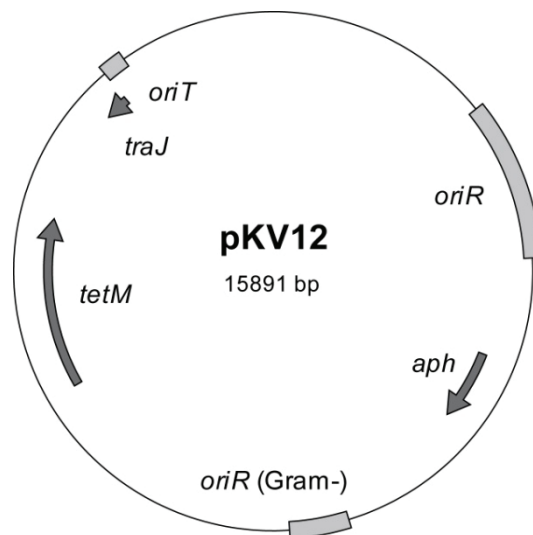
**Abb. 54: Plasmidkarte von pBR322 aus *E. coli*:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *amp*: Ampicillin-Resistenzgen, *tet*: Tetracyclin-Resistenzgen; der blaue Kasten markiert die Gram-negative Region für die Replikation (*ori pBR322*).



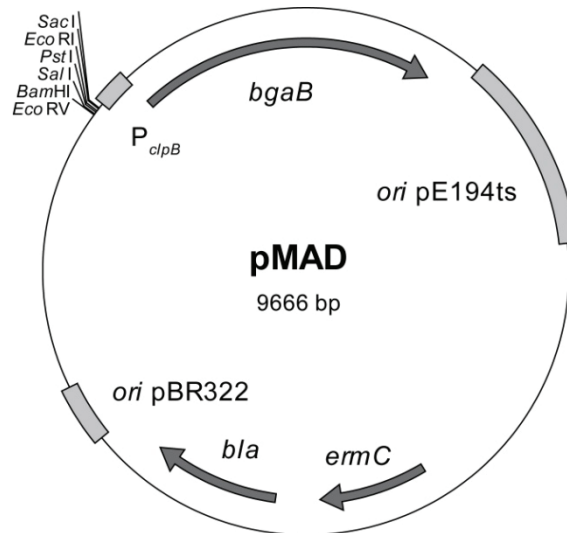
**Abb. 55: Plasmidkarte von pIM13 aus *B. subtilis*:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *repL*: Gram-positives Replikationsprotein, *ermC*: Erythromycin/Clarithromycin-Resistenzgen.



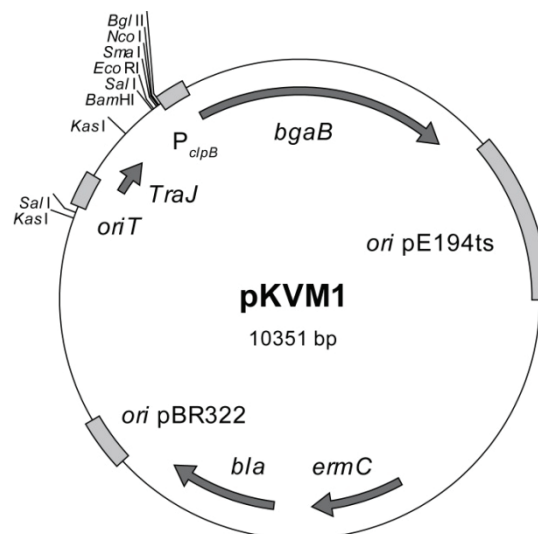
**Abb. 56: Plasmidkarte vom *C. perfringens*/*E. coli*-Shuttlevektor pJIR750:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *rep*: Gram-positives Replikationsprotein, *catP*: Cloramphenicol/Thiamphenicol-Resistenzgen, *lacZ*: Fragment der  $\beta$ -Galactosidase für Blau-Weiß-Screening; blaue Kästen markieren für Regionen für die Gram-negative (*oriEC*) und Gram-positive Replikation (*oriIP404*).



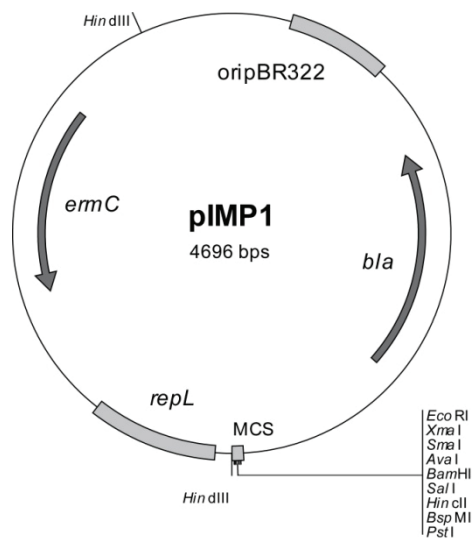
**Abb. 57: Plasmidkarte von pKV12:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *tetM*: Tetracyclin-Resistenzgen, *aph*: Kanamycin-Resistenzgen, *traJ*: Initiationsprotein für DNA-Transfer; blaue Kästen markieren für Regionen für die Replikation (*oriR*) und Konjugation (*oriT*)



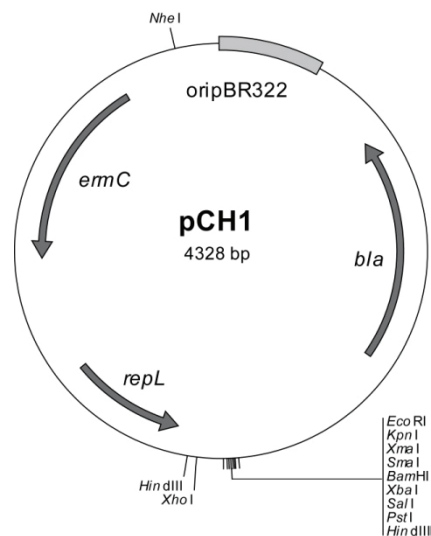
**Abb. 58: Plasmidkarte vom *Bacillus/E. coli*-Shuttlevektor pMAD:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *bla*: Ampicillin-Resistenzgen, *ermC*: Clarithromycin/Erythromycin-Resistenzgen, *bgaB*:  $\beta$ -Galactosidase; blaue Kästen markieren für Regionen für die Gram-negative (*ori*pBR322) und Gram-positive Replikation (*ori*pE194ts) und den konstitutiven Promotor  $P_{clpB}$  aus *Bacillus*.



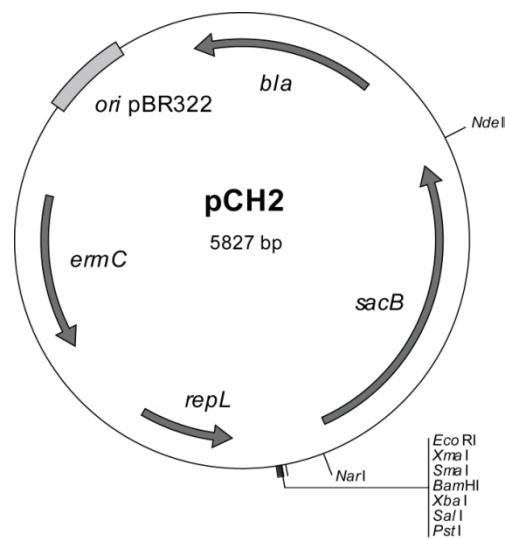
**Abb. 59: Plasmidkarte vom *Bacillus/E. coli*-Shuttlevektor pKVM1:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *bla*: Ampicillin-Resistenzgen, *ermC*: Clarithromycin/Erythromycin-Resistenzgen, *bgaB*:  $\beta$ -Galactosidase und *traJ*: Initiationsprotein für DNA-Transfer; blaue Kästen markieren für Regionen für die Gram-negative (*ori*pBR322) und Gram-positive Replikation (*ori*pE194ts), Konjugation (*oriT*) und den konstitutiven Promotor  $P_{clpB}$  aus *Bacillus*.



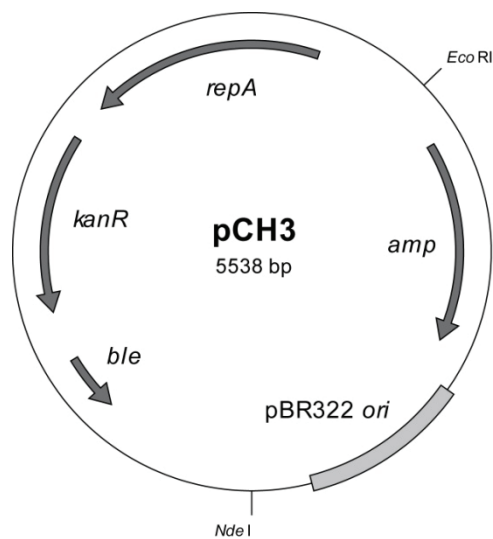
**Abb. 60: Plasmidkarte des *Clostridium/E.coli*-Shuttlevektors pIMP1:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *bla*: Ampicillin-Resistenzgen, *ermC*: Clarithromycin/Erythromycin-Resistenzgen; blaue Kästen markieren für Regionen für die Gram-negative (*oripBR322*) und Gram-positive Replikation (*repL*) und die *multiple cloning site* (MCS)



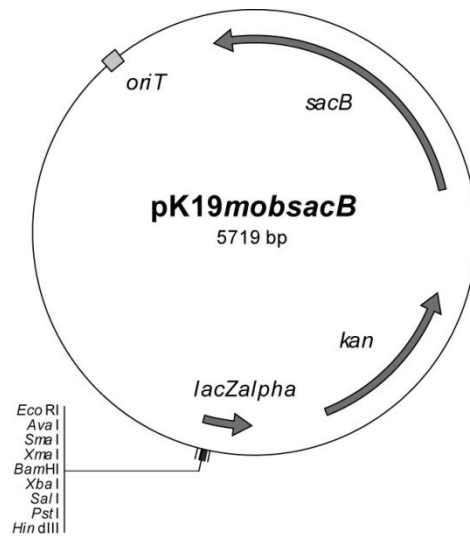
**Abb. 61: Plasmidkarte des *Clostridium/E.coli*-Shuttlevektors pCH1:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *bla*: Ampicillin-Resistenzgen, *ermC*: Clarithromycin/Erythromycin-Resistenzgen; *repL*: Gram-positives Replikationsprotein; blaue Kästen markieren für Regionen für die Gram-negative (*oripBR322*). pCH1 wurde aus pIM13 und pUC19 konstruiert. Es wurden jeweils die Schnittstellen *NheI* und *XhoI* an PCR-Produkte von Teilbereichen der beiden Plasmide angefügt.



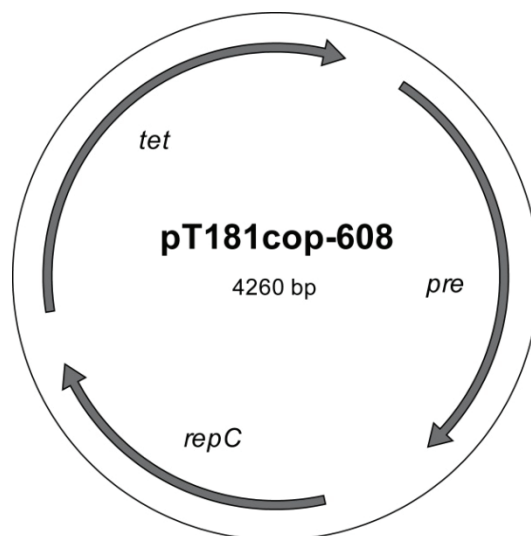
**Abb. 62: Plasmidkarte von Vektor pCH2:** das Gen *sacB* von pK19*mobsacB* wurde via PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *NdeI* und *NarI* in pCH1 kloniert



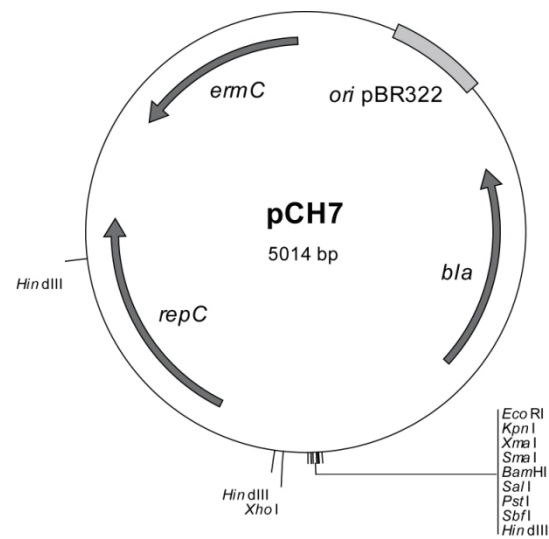
**Abb. 63: Plasmidkarte des *Clostridium/E.coli*-Shuttlevektors pCH3:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *amp*: Ampicillin-Resistenzgen, *kanR*: Kanamycin-Resistenzgen, *ble*: Bleomycin-Resistenzgen, *repA*: Gram-positives Replikationsprotein; der blaue Kasten markiert die Gram-negative Region für die Replikation (pBR322 *ori*). pCH3 wurde aus pUB110 und pBR322 konstruiert. Die beiden Plasmide wurden mit *NdeI* und *EcoRI* geschnitten, die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und ligiert.



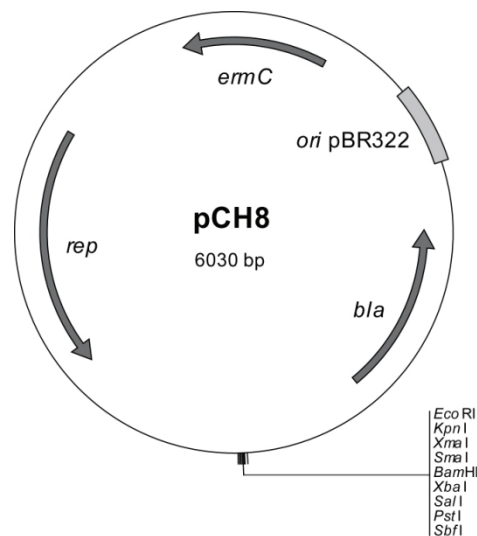
**Abb. 64: Plasmidkarte von pK19mobsacB:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *kan*: Kanamycin-Resistenzgen, *sacB*: Levansucrase, *lacZalpha*: Fragment der β-Galactosidase für Blau-Weiß-Screening; der blaue Kasten markiert für die Region der Konjugation (*oriT*).



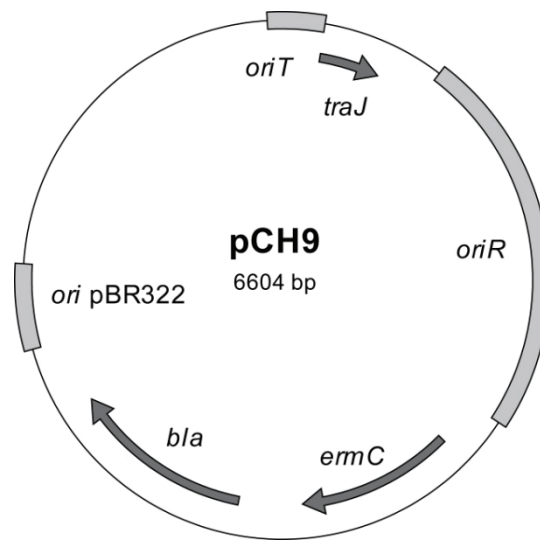
**Abb. 65: Plasmidkarte von pT181cop-608:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *tet*: Tetracyclin-Resistenzgen, *repC*: Gram-positives Replikationsprotein, *pre*: kodiert für ein Protein mit Funktion für zielgenaue Rekombination



**Abb. 66: Plasmidkarte von pCH7:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *bla*: Ampicillin-Resistenzgen, *ermC*: Clarithromycin/Erythromycin-Resistenzgen; *repC*: Gram-positives Replikationsprotein; der blaue Kasten markiert die Gram-negative Region für die Replikation (*ori pBR322*). pCH7 besteht aus dem Grundgerüst von pCH1, bei dem das Gram-positives Replikationsprotein *repL* durch Hybridisierung durch *repC* von pT181cop-608 ausgetauscht wurde. Konstruiert wurde der Vektor mit den Hybridisierungsprimern pCH1\_rep\_F1, pCH1\_rep\_F1N, pCH1\_rep\_R1, pCH1\_rep\_R1N, pT181\_Hyb\_F1, pT181\_Hyb\_F2, pT181\_Hyb\_R1 und pT181\_Hyb\_R2.



**Abb. 67: Plasmidkarte von pCH8:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *bla*: Ampicillin-Resistenzgen, *ermC*: Clarithromycin/Erythromycin-Resistenzgen; *rep*: Gram-positives Replikationsprotein; der blaue Kasten markiert die Gram-negative Region für die Replikation (*ori pBR322*). pCH8 besteht aus dem Grundgerüst von pCH1, bei dem das Gram-positives Replikationsprotein *repL* durch Hybridisierung durch *rep* von pJIR750 ausgetauscht wurde. Konstruiert wurde der Vektor mit den Hybridisierungsprimern pCH1\_rep\_F1, pCH1\_rep\_F1N, pCH1\_rep\_R1, pCH1\_rep\_R1N, pIP404\_Hyb\_F1, pIP404\_Hyb\_F2, pIP404\_Hyb\_R1 und pIP404\_Hyb\_R2.



**Abb. 68: Plasmidkarte von pCH9:** rote Pfeile markieren Gene in ihrer Orientierung auf dem Plasmid: *bla*: Ampicillin-Resistenzgen, *ermC*: Clarithromycin/Erythromycin-Resistenzgen und *traJ*: Initiationsprotein für DNA-Transfer; blaue Kästen markieren für Regionen für die Gram-negative (*ori* pBR322) und Gram-positive Replikation (*oriR* von pKV12) und Konjugation (*oriT*). pCH9 wurde aus pKVM1 und pKV12 konstruiert. Das Grundgerüst von pKVM1 wurde mit den Primern pMR12\_rep\_fwd und pMR12\_rep\_rev via PCR amplifiziert und die Schnittstellen von *EcoRV* und *BsrGI* angefügt. Dieses PCR-Produkt und der Vektor pKV12 wurden mit den beiden Enzymen *EcoRV* und *BsrGI* geschnitten, die entsprechenden Segmente über Gelextraktion aufgereinigt und ligiert.



---

## Lebenslauf

### Claudia Maria Held

19. September 1981                      geboren in Landshut  
deutsche Staatsbürgerschaft
- 1987 – 1991                                Besuch der Grundschule in Kronwinkl
- 1991 – 2001                                Besuch des Gymnasiums Seligenthal in Landshut  
Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
- 10/2001 – 7/2006                        Studium der Biologie (Diplom) an der Universität  
Regensburg
- 7/2005 – 7/2006                        Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Wirth am  
Lehrstuhl für Mikrobiologie mit dem Thema  
„Charakterisierung von Zellanhängen methanogener  
Archaeen“
- 4/2007 – 3/2008                        Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden  
Dissertation am Institut für genomische und angewandte  
Mikrobiologie an der Georg-August-Universität Göttingen  
unter Prof. W. Liebl in der Arbeitsgruppe von Dr. A.  
Ehrenreich
- seit 4/2008                                Fortsetzung der Dissertation nach Umzug an das Institut  
für Mikrobiologie der Technischen Universität München  
unter Prof. W. Liebl in der Arbeitsgruppe von Dr. A.  
Ehrenreich



## Publikationen

hervorgegangen aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen:

Köpke, M., **Held, C.**, Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G. & Dürre, P. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29): 13087-13092.

Beitrag:

- Annotation des Genoms von *C. ljungdahlii*
- Analyse und Rekonstruktion des Stoffwechsels

**Held, C.**, Dürre, P., Liebl, W. and Ehrenreich, A. (2013) Growth of *Clostridium ljungdahlii* on Ethanol and Betaine in a Stickland-analogous Reaction; in Vorbereitung

Beitrag:

- Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche

Weitere Publikationen:

Grimmler, C., **Held, C.**, Liebl, W., & Ehrenreich, A. 2010. Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of *d*-glucose and *d*-xylose. *Journal of Biotechnology*, 150(3): 315-323.

Beitrag:

- Verbesserung der Methodik und Auswertung der DNA Microarray Experimente
- Verbesserung der Methodik bei der anaeroben Kultivierung



## Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Liebl für die Überlassung dieses interessanten und sehr vielseitigen Themas und die Möglichkeit meine Dissertation an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können. Vielen Dank für das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Meckenstock und Prof. Dr. Mewes als Mitglieder der Prüfungskommission.

Dr. Armin Ehrenreich möchte ich für seine Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft und seinen Ideenreichtum herzlich danken, ebenso wie für die Möglichkeit selbstständig arbeiten und eigene Ideen verwirklichen zu können. Vielen Dank für die Gelegenheit, an nationalen und internationalen Tagungen teilnehmen zu können.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Göttinger Genomlabors möchte ich für die nette Aufnahme trotz anfänglicher Verständigungsschwierigkeiten aufgrund „innerdeutscher Sprachbarrieren“ danken. Vielen Dank für den Einführung in die Genomanalyse und -annotation ebenso für die angenehme Atmosphäre. Besonderer Dank gilt Heiko Liesegang und Antje Wollherr, die einem „User“ wie mir bei allen Computerproblemen mit Rat und Tat zur Seite standen. Darüber hinaus den Mitgliedern des „alten“ Ehrenreich-Labors, v. a. Christina und Marco für die Einführung in die Ionenchromatographie und RNA-Isolierung.

Für eine lustige Arbeitsatmosphäre und viele wissenschaftliche und unwissenschaftliche Diskussionen möchte ich den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Ehrenreich in Freising danken, v. a. Melanie, Michael, David, Hedwig, Daniel und Björn. Ebenso allen weiteren Mitgliedern des Lehrstuhls in Freising mit denen man im und außerhalb des Labors Spaß haben konnte: Johanna, Bene, Nina und Chrissi, Lena, Robert, Dani, Trang, um nur einige zu nennen.

Vielen Dank auch an Vladimir und Sepp, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, wenn ich Probleme mit Gas oder Schwierigkeiten mit dem Anaerobenzelt hatte. Herzlichen Dank auch an unsere technischen Assistentinnen und guten Feen des Instituts, die bei den unterschiedlichsten Schwierigkeiten mit ihrer Erfahrung weiterhelfen und

## Danksagung

---

Apparaturen aus den hintersten Winkeln des Kellers hervorzaubern konnten: Beate, Helga, Konny und Sibylle.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern sowie meinen Geschwistern Andreas nebst Familie, Lisa, Markus und Chrissy, die immer an mich geglaubt haben und während meines Studiums und der Promotion immer an meiner Seite gestanden haben. Vielen Dank für eure Liebe und Unterstützung.