

**DIE BEDEUTUNG DES *FRU*-OPERONS FÜR DIE
AUFNAHME VON FRUKTOSE
IN *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM***

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR RERUM NATURALIUM (DR. RER. NAT.)

DER MATHEMATISCHE-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

VORGELEGT VON:

CHRISTINE VOIGT
GEB. AM 24.02.1985 IN GÜSTROW

ROSTOCK, 28. JANUAR 2014

ERSTGUTACHTER: **PROF. DR. HUBERT BAHL**
UNIVERSITÄT ROSTOCK
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT,
INSTITUT FÜR BIOWISSENSCHAFTEN,
ABTEILUNG MIKROBIOLOGIE

ZWEITGUTACHTER: **PROF. DR. MARTIN HAGEMANN**
UNIVERSITÄT ROSTOCK
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT,
INSTITUT FÜR BIOWISSENSCHAFTEN,
ABTEILUNG PFLANZENPHYSIOLOGIE

DATUM DER EINREICHUNG: 29.01.2014

WISSENSCHAFTLICHES KOLLOQUIUM: 13.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Zielstellung.....	1
1.2 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	2
1.3 Systeme zur Aufnahme von Kohlenhydraten	5
1.4 Regulation der Aufnahme von Kohlenhydraten	6
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Organismen und Plasmide	8
2.2 Oligonukleotide.....	9
2.3 Nährmedien	11
2.3.1 Medium für <i>E. coli</i>	11
2.3.2 Medium für <i>C. acetobutylicum</i>	11
2.3.3 Medienzusätze.....	13
2.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle.....	14
2.5 Zellanzucht.....	14
2.5.1 Zellanzucht von <i>E. coli</i>	14
2.5.2 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i> auf Festmedium.....	15
2.5.3 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i> in statischer Kultur	15
2.6 Bestimmung physiologischer Parameter.....	15
2.6.1 Optische Dichte	15
2.6.2 Messung des pH-Wertes	16
2.6.3 Lichtmikroskopie	16
2.6.4 Berechnung der Wachstumsrate und der Verdopplungszeit	16
2.6.5 Gaschromatographie	16
2.6.6 Optisch-enzymatische Kohlenhydrat-Bestimmung	17
2.7. Isolierung von Nukleinsäuren	19
2.7.1 Plasmid-Minipräparation aus <i>E. coli</i>	19
2.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	19
2.7.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	20
2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren	20

2.8.1 Enzymatische Modifikation von DNA	20
2.8.1.1 Restriktion von DNA.....	20
2.8.1.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	22
2.8.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	22
2.8.3 Reinigung von Nukleinsäuren.....	22
2.8.3.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	22
2.8.3.2 Kit-basierte DNA-Aufreinigung.....	22
2.8.4 Agarosegelektrophorese	23
2.8.4.1 Standard-Gelelektrophorese	23
2.8.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese	23
2.8.5 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle	24
2.8.6. Polymerase-Kettenreaktion	25
2.8.6.1 Primerdesign.....	25
2.8.6.2 Standard-PCR	26
2.8.6.3 Splicing by overlap extension - PCR.....	26
2.8.6.4 Fusions-PCR.....	27
2.8.6.5 5'-RACE-PCR	27
2.8.7. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	28
2.8.7.1 Sondenherstellung	28
2.8.7.2 Southern Blot.....	28
2.8.7.3 Southern Blot - Hybridisierung	29
2.8.7.4 Detektion Digoxigenin-markierter DNA.....	30
2.8.7.5 Northern Blot.....	30
2.8.7.6 Northern Blot - Hybridisierung	31
2.8.7.7 Detektion Digoxigenin-markierter DNA.....	31
2.9. DNA-Transfer in Mikroorganismen	32
2.9.1 CaCl ₂ -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i>	32
2.9.2 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	33
2.9.3 Transformation von <i>C. acetobutylicum</i> durch Elektroporation	33
2.10 Konstruktion von Defektmutanten	34
2.10.1 ClosTron®-Insertionsmutagenese.....	34
2.10.2 Homologe Rekombination	34
2.11 Arbeiten mit Proteinen	35
2.11.1 Isolierung von Gesamtprotein mittels Ultraschall	35

2.11.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	35
2.11.3 Affinitätschromatographie mit <i>Strep</i> -Tactin-Sepharose	36
2.11.4 Polyacrylamidgelektrophorese	36
2.11.4.1 Eindimensionale SDS-PAGE	36
2.11.4.2 Kolloidale Coomassie-Färbung	36
2.11.5 Western Blot	37
2.11.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay	37
2.11.7 Bestimmung der Phosphofruktokinase Aktivität	38
2.12. Bezugsquellen	39
3. Ergebnisse.....	41
3.1 Organisation der Fruktose-Phosphotransferase Systeme	41
3.2 Konstruktion von PTS-defizienten Stämmen	42
3.2.1 Homologe Rekombination in <i>C. acetobutylicum</i>	42
3.2.2 ClosTron [®] -Insertionsmutagenese in <i>C. acetobutylicum</i>	44
3.2.3 Transformation, Selektion und Verifikation der <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten.....	45
3.3 Plasmid-basierte Komplementation von <i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fru</i>	47
3.3.1 Konstruktion des Komplementationsplasmides pT <i>fru</i> -catP	48
3.3.2 Homologe Expression des <i>fru</i> -Operons in <i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fru</i>	49
3.4 Charakterisierung der Defektmutanten von <i>C. acetobutylicum</i>	50
3.4.1 Glukose-Fermentation in statischen Kulturen.....	51
3.4.2 Fruktose-Fermentation in statischen Kulturen	53
3.4.3 Mannose-Fermentation in statischen Kulturen	56
3.5 Regulation der Fruktose-Aufnahme	58
3.5.1 Der Aufbau des <i>fru</i> -Operons	59
3.5.2 FruR – ein putativer Regulator des Fruktose-Metabolismus	60
3.5.3 Promotor-Analyse des <i>fru</i> -Operons	60
3.5.3.1 Identifikation von putativen Regulator-Bindestellen	62
3.5.4 Funktionelle Analyse des potentiellen Regulators FruR und des Regulators CcpA	63
3.5.4.1 Klonierung und Heterologe Expression von FruR und CcpA in <i>E. coli</i>	63
3.5.4.2 Promotor-Bindungsstudien von FruR und CcpA <i>in vitro</i>	65
3.5.5 Herstellung einer FruR-Defektmutante <i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fruR</i>	68

3.5.6 Plasmid-basierte Komplementation von <i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fruR</i>	69
3.5.7 Homologe Überexpression von FruR	70
3.5.8 Wachstumsphysiologische Charakterisierung von <i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fruR</i> und pT:: <i>fruR</i>	71
3.5.9 Bestimmung der Phosphofruktokinase-Aktivitäten.....	76
4. Diskussion	78
4.1 Die Aufnahme von Fruktose in <i>C. acetobutylicum</i>	79
4.1.1 Konstruktion von PTS-defizienten <i>C. acetobutylicum</i> -Stämmen	81
4.1.2 Die Bedeutung des PTS ^{Fru} für die Fruktose-Aufnahme von <i>C. acetobutylicum</i>	82
4.1.3 Die Rolle der Man-PTS für die Fruktose-Aufnahme von <i>C. acetobutylicum</i> 86	86
4.1.4 Ausblick	87
4.2 Die Regulation der Fruktose-Aufnahme in <i>C. acetobutylicum</i>	88
4.2.1 Das Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i> mit Glukose und Fruktose im Gemisch.....	89
4.2.2 CcpA als Transkriptionsrepressor der Fruktose-Aufnahme.....	91
4.2.3 FruR als Transkriptionsaktivator der Fruktose-Aufnahme	92
4.2.4 Regulationsmodell der Fruktose-Aufnahme	96
5. Zusammenfassung	98
6. Literaturverzeichnis	99
7. Anhang	118
Danksagung	122
Lebenslauf	123
Selbständigkeitserklärung	124

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere, Adenin, <i>Aeromonas</i>
<i>A.</i>	<i>Aqua</i>
aa	,aminoacid'
ABE	Aceton, Butanol und Ethanol
<i>ad</i>	auffüllen auf
ADP	Adenosin-5-diphosphat
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	,American Type Culture Collection'
ATP	Adenosin-5-triphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
c	Konzentration, copy, centi
C	Cytosin
C-	Carboxy-, Kohlenstoff-
<i>C.</i>	<i>Clostridium, Corynebacterium</i>
°C	Grad Celsius
CAC	<i>C. acetobutylicum</i> chromosome (Chromosom)
CAP	<i>C. acetobutylicum</i> megaplasmid pSOL1 (Megaplasmid pSOL1)
CcpA	Catabolite control protein A
CCR	Carbon catabolite repression (Katabolitenrepression)
CDP	Cyclodioxetanphosphat
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
<i>cre</i>	catabolite responsive element
d	Schichtdicke, Desoxy
Da	Dalton
<i>dest.</i>	destilliert

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EI	Enzyme I (PTS)
EII	Enzym II (PTS)
EBS	,Exon binding site'
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
Em	Erythromycin
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
F-1-P	Fruktose-1-Phosphat
F-6-P	Fruktose-6-Phosphat
FBP	Fruktose-1,6-Bisphophat
Fru	Fruktose
fw	forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
Glu	Glukose
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPr	Histidine containing protein (heat stable protein)
HTH	Helix-turn-Helix
IBS	,Intron binding site'
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	kilo
KOH	Kaliumhydroxid
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
l	Liter, Länge

LB	Luria-Bertani
log	dekadischer Logarithmus
ln	natürlicher Logarithmus
μ	mikro (10^{-6})
m	Meter, milli (10^{-3})
M	Molar
Man	Mannose
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mod.	Modifiziert
mRNA	messanger RNA
MW	Molekulargewicht
N-	Amino-
n	nano (10^{-9})
N	Normal, Adenin oder Cytosin oder Thymin oder Guanin
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NH_4OH	Ammoniumhydroxid
Nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	,open reading frame'
p	piko (10^{-12})
P	Phosphat
PABA	Paraaminobenzoesäure
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTS	Phosphotransferase System
PCR	Polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R	Adenin oder Guanin
rbs	ribosome binding site
RCA	reinforced clostridial agar
rev	reverse

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Serin
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
s	Sekunde
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOE	,splicing by overlap extension'
T	Thymin
TAE	Tris-Aacetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
V	Volt, Volumen
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt, Adenin oder Thymin
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Übersicht des biphasischen Fermentationsmetabolismus in <i>C. acetobutylicum</i>	3
Abb. 1.2: Übersicht über die Phosphotransferase Systeme in <i>C. acetobutylicum</i>	4
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Phosphoenolpyruvat - Phosphotransferase Systems	5
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Katabolitenrepression (CCR) in Gram- positiven Bakterien	7
Abb. 3.1: Genetische Organisation der Fruktose Phosphotransferase Systeme von <i>C. acetobutylicum</i>	41
Abb. 3.2: Fusions-PCR zur Herstellung des Homologen Bereiches für die Homologe Rekombination	43
Abb. 3.3: Plasmidisolation und Restriktionsanalyse positiver Rekombinations- plasmide pCons::fru	44
Abb. 3.4: Repräsentative Restriktionsanalyse rekombinanter pMTL007C-E2-Klone (<i>cac1457</i>) mit <i>Hind</i> III und <i>Bsp</i> 1407I.....	45
Abb. 3.5: Verifikation der Mutanten Δfru , <i>manI</i> ::int und $\Delta manII$ mittels PCR-Analyse und Southern Hybridisierung.....	47
Abb. 3.6: Plasmidkarte von pThydA-catP.....	48
Abb. 3.7: Restriktionsanalyse von pTfru-catP-Klonen mit <i>Cfr</i> 9I.....	49
Abb. 3.8: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von <i>C. acetobutylicum</i> Δfru _compl..	50
Abb. 3.9: Wachstum, Glukose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der <i>C. acetobutylicum</i> Defektmutanten Δfru , <i>manI</i> ::int und $\Delta manII$ vergleichend zum Wildtyp	52
Abb. 3.10: Wachstum, Fruktose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der <i>C. acetobutylicum</i> Defektmutanten Δfru , <i>manI</i> ::int und $\Delta manII$ vergleichend zum Wildtyp	54
Abb. 3.11: Wachstum, Mannose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der <i>C. acetobutylicum</i> Defektmutanten Δfru , <i>manI</i> ::int und $\Delta manII$ vergleichend zum Wildtyp	57
Abb. 3.12: Transkriptionsanalyse des <i>fru</i> -Operons in <i>C. acetobutylicum</i>	59
Abb. 3.13: Analyse des Promotorbereiches und des Terminators des <i>fru</i> -Operons in <i>C. acetobutylicum</i>	61

Abb. 3.14: Alignment der Promotorregion des <i>fru</i> -Operons in <i>C. acetobutylicum</i> mit den entsprechenden Homologen aus anderen Gram-positiven Organismen ...	63
Abb. 3.15: Native Aufreinigung des FruR–Strep-tagII- und CcpA–Strep-tagII-Proteins aus Proteinextrakten nach heterologer Expression in <i>E. coli</i> DH5 α	64
Abb. 3.16: Aufgereinigte PCR-Amplifikate ausgewählter Promotorbereiche	65
Abb. 3.17: Interaktion von FruR–Strep-tagII mit dem Promotorbereiche des <i>fru</i> -Operons.....	66
Abb. 3.18: Interaktion von CcpA–Strep-tagII mit den Promotorbereichen des <i>fru</i> -Operons und von <i>xylB</i>	67
Abb. 3.19: Verifikation der Defektmutante <i>C. acetobutylicum</i> $\Delta fruR$	68
Abb. 3.20: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von <i>C. acetobutylicum</i> $\Delta fruR_compl$	70
Abb. 3.21: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von <i>C. acetobutylicum</i> pT:: <i>fruR</i>	71
Abb. 3.22: Wachstum, Glukose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der <i>C. acetobutylicum</i> Defektmutante $\Delta fruR$ und des Überexpressionsstammes pT:: <i>fruR</i> vergleichend zum Wildtyp	72
Abb. 3.23: Wachstum, Fruktose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der <i>C. acetobutylicum</i> Defektmutante $\Delta fruR$ und des Überexpressionsstammes pT:: <i>fruR</i> vergleichend zum Wildtyp..	73
Abb. 3.24: Wachstum, Glukose- und Fruktose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der <i>C. acetobutylicum</i> Defektmutante $\Delta fruR$ und des Überexpressionsstammes pT:: <i>fruR</i> vergleichend zum Wildtyp.....	75
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der beiden putativen Fruktose-Aufnahmewege in <i>C. acetobutylicum</i>	81
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Transkriptionregulation des <i>fru</i> -Operons in <i>C. acetobutylicum</i>	97
Abb. A.1: Vektorkarte von pCons:: <i>upp</i>	118
Abb. A.2: Vektorkarte von pMTL007C-E2.....	118
Abb. A.3: Plasmidkarte von pThydA.....	119
Abb. A.4: Wachstumsraten von <i>C. acetobutylicum</i> -Stämmen auf Glukose, Fruktose und Mannose.....	119
Abb. A.5: Fermentationsendprodukte von <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp während des Wachstums mit Glukose bzw. Fruktose als C-Quelle	121
Abb. A.6: Verlauf der Säurereproduktion von <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp und Δfru während des Wachstums mit Fruktose als Substrat.....	121

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Organismen	8
Tab. 2.2: Vektoren.....	8
Tab. 2.3: Rekombinante Plasmide.....	9
Tab. 2.4: Oligonukleotide.....	9
Tab. 2.5: Medienzusätze.....	13
Tab. 2.6: Verwendete Restriktionsendonukleasen	21
Tab. 2.7: Bezugsquellen für Chemikalien	40
Tab. 3.1: Spezifische Aktivität der 1-Phosphofruktokinase und der 6-Phosphofruktokinase von verschiedenen <i>C. acetobutylicum</i> -Stämmen	76
Tab. A.1: Vergleich der wachstumsphysiologischen Parameter der statischen Kulturen mit den drei C-Quellen Glukose, Fruktose und Mannose verschiedener <i>C. acetobutylicum</i> -Stämme	120

1. Einleitung

Allen Bakterien ist gemein, dass sie auf Energiequellen aus ihrer Umwelt angewiesen sind, um Energie in Form von ATP zu generieren. Das ATP wird sowohl für die Gewährleistung als auch Aufrechterhaltung zellulärer Prozesse benötigt. Die Mehrheit der bisher entdeckten und untersuchten Bakterien besitzt eine heterotrophe Lebensweise. Das bedeutet, dass sowohl ihre Energie- als auch ihre Kohlenstoffquellen aus organischen Substanzen bestehen. Die Gattung der Clostridien kann hinsichtlich ihrer bevorzugten Energiequelle in zwei Gruppen eingeteilt werden: (1) in proteolytische und (2) saccharolytische Clostridien. Zur Gruppe der proteolytischen Clostridien zählen z. B. die pathogenen Vertreter *Clostridium botulinum* und *Clostridium sporogenes* und zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind Proteine zu hydrolysieren und Aminosäuren zu fermentieren (Ljungdahl *et al.*, 1989). Die Gruppe der saccharolytischen Clostridien, zu denen u. a. auch *Clostridium acetobutylicum* gehört, nutzt bevorzugt Kohlenhydrate als Energiequelle (Reid, 2005). Welche Kohlenhydrate dabei im Speziellen aufgenommen und umgesetzt werden können, ist von der genetischen Ausstattung der jeweiligen Art abhängig.

1.1 Zielstellung

Die Themenstellung dieser Arbeit leitete sich aus einem Aspekt des systembiologischen Projektes COSMIC 2 („*Clostridium acetobutylicum* systems microbiology“) ab, wobei die Fruktose-Aufnahme durch *C. acetobutylicum* näher beleuchtet werden sollte. Über die Aufnahme und den Transport von Fruktose in *C. acetobutylicum* ist nur wenig bekannt. Von den 13 identifizierten Phosphotransferase Systemen (PTS) in *C. acetobutylicum* konnten drei PTS (CAC0233-CAC0234; CAC1457-CAC1460; CAP0066-CAP0068) aufgrund ihrer Homologien zu bereits bekannten PTS aus anderen Organismen und durch vergleichende Transkriptomanalysen identifiziert werden, die mutmaßlich für die Fruktose-Verwertung verantwortlich sind (Mitchell und Tangney, 2005; Servinsky *et al.*, 2010). Eine Bestätigung dieser Annahme auf physiologischer Ebene wurde bisher noch nicht erbracht. Demnach bestand das erste Ziel dieser Arbeit darin, die Beteiligung dieser drei PTS (Abb. 1.2) an der Fruktose-Aufnahme zu untersuchen. Zusätzlich sollte geklärt werden, welches PTS hauptsächlich für den Transport und die Umsetzung verantwortlich ist.

Ein weiteres Hauptaugenmerk bestand in der Untersuchung der Regulation der Fruktose-Aufnahme. Fruktose gehört neben Glukose zu den präferentiell genutzten C-Quellen von *C. acetobutylicum* (Servinsky *et al.*, 2010). Innerhalb dieser Arbeit sollte herausgestellt werden, ob beide Hexosen simultan aufgenommen werden oder aber sequentiell umgesetzt werden. Anhand kürzlich veröffentlichter *in silico*-Daten zeigte sich, dass die drei potentiellen Fruktose-PTS möglicherweise der Katabolitenrepression (CCR) unterliegen (Ren *et al.*, 2012). Demnach galt es zu untersuchen, ob die Fruktose-Aufnahme tatsächlich der CCR unterliegt und ob eventuell zusätzlich noch weitere Regulationsmechanismen eine Rolle spielen.

Zum besseren Verständnis wird in den folgenden Kapiteln zunächst der Organismus *C. acetobutylicum* kurz vorgestellt. Im Weiteren werden die Kohlenhydrat-Aufnahme mittels der Phosphotransferase Systeme (PTS) und dessen generelle Regulation durch die Katabolitenrepression (CRR) näher beleuchtet.

1.2 *Clostridium acetobutylicum*

C. acetobutylicum ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, strikt anaerobes Bakterium aus dem Phylum der *Firmicutes* (Madigan und Martinko, 2006). Diese Art kommt natürlicherweise in Habitaten wie dem Boden, Abwasser und Schlamm vor und gilt als Modellorganismus für apathogene Clostridien (Bahl und Dürre, 1993). Neben der Befähigung zur Bildung von Endosporen zeichnet es sich durch seinen biphasischen Fermentationsmetabolismus aus (Abb. 1.1). Bei der Fermentation von Kohlenhydraten treten generell zwei charakteristische Wachstumsphasen auf. Während des exponentiellen Wachstums, der sogenannten Säurephase (Acidogenese), werden die aufgenommenen Kohlenhydrate über das Intermediat Pyruvat zu den Säuren Acetat und Butyrat umgesetzt (Jones und Woods, 1986). Der Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase ist durch die Akkumulation der Säuren im externen Medium und einem daraus resultierenden Absinken des pH-Wertes sowie einem zunehmenden Nährstoffmangel gekennzeichnet. Diese Umstände führen zur Initiation des Lösungsmittelhifses (Paredes *et al.*, 2005). Einhergehend mit einer drastischen Veränderung des Genexpressions-Profiles von *C. acetobutylicum* wird die Lösungsmittelphase (Solventogenese) eingeleitet (Alsaker und Papoutsakis, 2005). In dieser Wachstumsphase werden die Säuren reassimiliert und zu den organischen Lösungsmitteln Aceton, Butanol und Ethanol im Verhältnis 3:6:1 umgesetzt (LEE *et al.*, 2008).

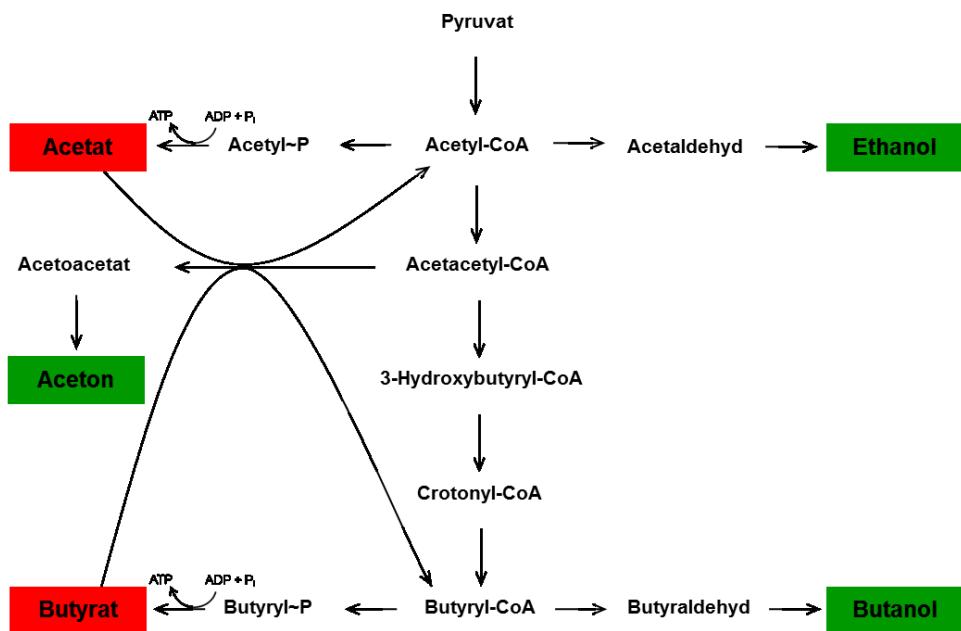


Abb. 1.1: Schematische Übersicht des biphasischen Fermentationsmetabolismus in *C. acetobutylicum*. Die erste Phase der Fermentation ist durch die Säurebildung gekennzeichnet (rot), wobei Energie in Form von ATP gebildet wird. In der zweiten Phase werden die zuvor gebildeten Säuren reassimiliert und in Lösungsmittel (grün) umgewandelt.

Durch die Fähigkeit der natürlichen Bildung von Aceton und Butanol machte sich *C. acetobutylicum* im Zuge der industriellen Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation bereits im letzten Jahrhundert einen Namen. Aceton wird noch heute in der chemischen Industrie als Ausgangsstoff für zahlreiche Synthesen wie z. B. die Herstellung von Acrylglass eingesetzt, wobei Butanol als potentielle Treibstoffalternative zum Erdöl im Fokus steht (Wilkins und Atiyeh, 2006; Lütke-Eversloh und Bahl, 2011). Im Zuge der Sequenzierung des Genoms von *C. acetobutylicum* (Nölling *et al.*, 2001) konnten ebenso die Gene identifiziert werden, welche für die Aceton- und Butanolsynthese verantwortlich sind. Damit wurde die Grundlage geschaffen, die Butanolproduktion mit Hilfe verschiedener Strategien des „Metabolic Engineering“ zu erhöhen und sie ökonomisch rentabel zu machen (Lehmann *et al.*, 2012; Cooksley *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2009). Ein großer Nachteil der ABE-Fermentation im Gegensatz zur chemischen Synthese besteht weiterhin in den hohen Substratkosten, die bis zu 79 % der gesamten Produktionskosten ausmachen (Green, 2011). Um die Effizienz des Fermentationsprozesses von *C. acetobutylicum* zu steigern und wirtschaftlicher für die industrielle Biotechnologie zu machen, ist es nicht nur notwendig die Fermentation zu optimieren, sondern ebenso die Substratverwertung des Bakteriums zu steigern. Die Aufnahme der Kohlenhydrate stellt dabei den ersten Schritt in der Umwandlung der Zucker zu den Lösungsmitteln Aceton, Butanol und Ethanol dar. Die vollständige Aufklärung der Re-

gulation und Mechanismen des Kohlenhydrat-Transportes und wichtig für die Optimierung des ABE-Fermentationsprozesses.

-Abbaus ist daher

C. acetobutylicum besitzt ein breites Substratspektrum und ist somit ideal dafür geeignet industrielle als auch landwirtschaftliche Abfallprodukte als Kohlenstoff- und Energiequellen zu verwerten (Servinsky *et al.*, 2010; Qureshi *et al.*, 2006; Ni *et al.*, 2012). Solche Substrate, wie z. B. Pflanzenrückstände und Stroh aus der Getreideernte, Kleie oder auch Melasse bestehen in der Regel aus Kohlenhydratgemischen, die vor allem Hexosen, Pentosen und Disaccharide enthalten. Besonders interessant sind dabei jene Substrate, die ein optimales Wachstum von *C. acetobutylicum* gewährleisten und günstig zu erwerben sind. Zu solchen preiswerten Rohstoffen und industriellen Abfallprodukten zählen u. a. Melasse, das Nebenprodukt der Zuckerraffination, Apfelftrester, sowie die Jerusalem-Artischocke (Topinambur). Diesen Rohstoffen ist gemein, dass sie als einen wesentlichen Bestandteil Fruktose enthalten und bereits für die Fermentation eingesetzt wurden (Syed *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Voget *et al.*, 1985).

Den dominierenden Aufnahmemechanismus von Kohlenhydraten in *C. acetobutylicum* repräsentieren die PTS. Mit Hilfe von Homologievergleichen mutmaßlicher PTS-EII-Domänen konnten in *C. acetobutylicum* 13 PTS und ihre Substrate identifiziert werden (Abb. 1.2; Nölling *et al.*, 2001; Mitchell und Tangney, 2005).

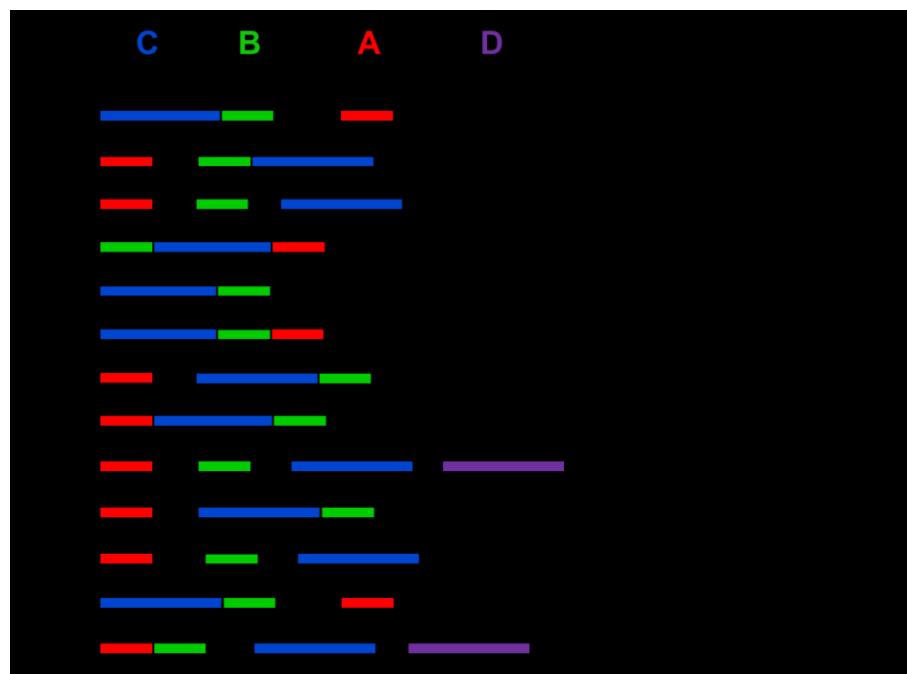


Abb. 1.2: Übersicht über die Phosphotransferase Systeme in *C. acetobutylicum* (Tangney und Mitchell, 2005; mod.). Die Nummern der ORFs befinden sich über den jeweiligen Proteinen, die durch horizontale Balken dargestellt sind. Der Aufbau jedes PTS ist durch die Organisation der Domänen innerhalb bzw. zwischen den Proteinen angedeutet, wobei jede Domäne durch eine Farbe repräsentiert wird. Die Reihenfolge der Proteine gibt die Reihenfolge der Gene innerhalb der jeweiligen Operone wieder.

1.3 Systeme zur Aufnahme von Kohlenhydraten

Für die Aufnahme von Kohlenhydraten besitzt *C. acetobutylicum* prinzipiell drei unterschiedliche Typen von Transportsystemen (Nölling *et al.*, 2001). Der Transport von Pentosen erfolgt sowohl durch ABC-Transporter (z. B. Ribose) als auch Symporter (z. B. Xylose und Arabinose). Hexosen, wie z. B. Glukose, Fruktose und Mannose, sowie Disaccharide (z. B. Saccharose und Laktose), Zuckeralkohole (z. B. Mannitol) und andere Zuckerderivate (z. B. Glukosamin) werden hingegen vornehmlich über Phosphotransferase Systeme (PTS) aufgenommen (Rodionov *et al.*, 2001; Servinsky *et al.*, 2012; Mitchell und Tangney, 2005; Postma *et al.*, 1993). Bisher konnten PTS nur in Bakterien gefunden werden, aber auch dort sind sie nicht ubiquitär verbreitet (Barbote und Saier, 2005; Ren und Paulsen, 2005). Im Gegensatz zum Transport durch ABC-Transporter und Symporter ist der Transport über ein PTS mit einer Phosphorylierung des Substrats verbunden, sodass dieses intrazellulär als Zucker-Phosphat vorliegt (Abb. 1.3).

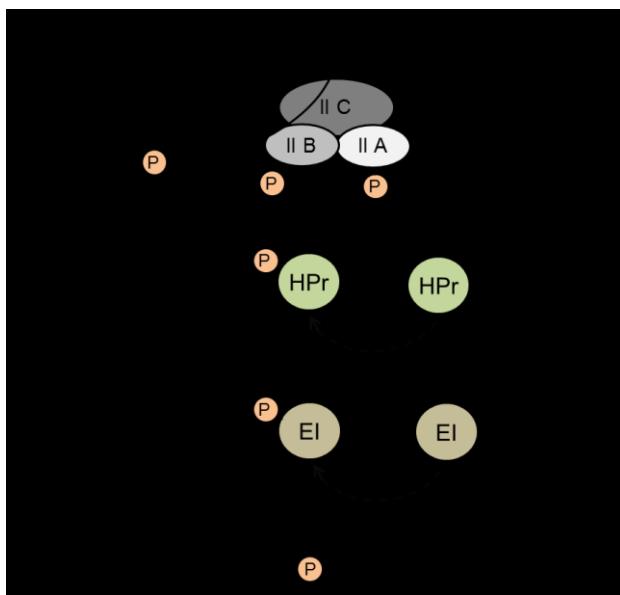


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Phosphoenolpyruvat - Phosphotransferase Systems (Görke und Stölke, 2008; mod.). Der Phosphatrest (P) wird vom Phosphoenolpyruvat (PEP) über das Enzym I (EI), das hitzestabile Protein HPr und den Enzym II-Komplex (EIIA, B, C) auf den Zucker übertragen. Somit liegt der Zucker intrazellulär in phosphorylierter Form vor und kann im weiteren Verlauf schließlich über die Glykolyse katabolisiert werden.

Das Phosphotransferase-Aufnahmesystem besteht aus zwei allgemeinen Proteinen, dem Enzym I (EI) und dem Histidin-enthaltenden, hitzestabilen Protein HPr, sowie aus einem Zucker-spezifischen Proteinkomplex Enzym II (EII). Das Enzym II ist eine Permease, die aus drei bis vier einzelnen Domänen (A, B, C, D) aufgebaut ist und sich aus ein bis vier Untereinheiten zusammensetzt (Abb. 1.3). Jeder EII-Komplex besteht dabei aus zwei hydrophilen Domänen (EIIA und EIIB) und aus einer oder zwei hydrophoben, membrangebundenen Domänen (EIIC und EIID) (Kotrba *et al.*, 2001; Postma *et al.*, 1993). Die während der Translokation übertragene Phosphatgruppe entstammt dem

Phosphoenolpyruvat (PEP), welches bei der Autophosphorylierung des EI als Phosphoryl-Donor dient. Das EI überträgt die Phosphatgruppe auf das HPr, welches an seinem Histidin-15-Rest phosphoryliert wird. Vom HPr-Protein wird der Phosphatrest über die verschiedenen Domänen des Substrat-spezifischen EII an den zu transportierenden Zucker übertragen. Der phosphorylierte Zucker wird dann über die Schritte der Glykolyse katabolisiert, wobei zwei Moleküle PEP generiert werden (Deutscher *et al.*, 2006; Görke und Stülke, 2008).

1.4 Regulation der Aufnahme von Kohlenhydraten

Die meisten heterotrophen Bakterien können eine Vielzahl von Kohlenhydraten verarbeiten und sich somit einem ständig wechselnden Nahrungsangebot anpassen. Für eine effiziente Aufnahme von unterschiedlichen Kohlenhydraten aus Gemischen haben Bakterien verschiedene Strategien entwickelt, um gezielt und möglichst schnell auf diese Veränderungen reagieren zu können (Servinsky *et al.*, 2010; Stülke und Hillen, 1999). Generell unterliegt die Aufnahme von Kohlenhydraten in Bakterien einer hierarchischen Struktur und wird durch einen komplexen Regulationsmechanismus, die sogenannte Katabolitenrepression (CRR – „carbon catabolite repression“), koordiniert. Das bedeutet, dass aus einem Kohlenhydratgemisch zunächst die C-Quelle verwertet wird, welche das bestmögliche Wachstum gewährleistet. Währenddessen wird die Aufnahme anderer, sekundärer C-Quellen reprimiert. Die Proteine für den Abbau sekundärer C-Quellen werden erst gebildet, wenn sie benötigt werden, d. h. wenn nur dieses Substrat vorhanden ist und kein ihm bevorzugtes mehr vorliegt (Warner und Lolkema, 2003). Für die Mehrheit der heterotrophen Bakterien stellt Glukose die bevorzugte C-Quelle dar (Singh *et al.*, 2008). Somit wird in Anwesenheit von Glukose im Medium die Aufnahme von sekundären C-Quellen reprimiert.

Das PTS spielt nicht nur für den Transport von Kohlenhydraten eine Rolle, sondern auch bei der Signaltransduktion für die CCR (Postma *et al.*, 1993; Stülke und Hillen, 1998). In Gram-positiven Bakterien übernimmt das HPr eine wesentliche Rolle bei der CCR (Abb. 1.4) und zeichnet sich durch den Besitzt von zwei Phosphorylierungsstellen aus. Neben seiner Phosphorylierung am His-15-Rest während der Phosphatübertragung vom EI auf das EII kann es auch noch an dem Ser-46-Rest phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung am Ser-Rest erfolgt in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrK/P) (Deutscher *et al.*, 2006; Galinier *et al.*, 1998; Rei-

zer *et al.*, 1998). Die HPrK/P ist ein bifunktionelles Enzym und fungiert als primärer Sensor hoher glykolytischer Aktivität. Bei Anwesenheit einer bevorzugten C-Quelle, wie z. B. Glukose, liegt intrazellulär eine hohe Konzentration an Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP) vor. Dadurch wird die HPrK/P stimuliert, um das HPr am Ser-46 in einer ATP-abhängigen Reaktion zu phosphorylieren. Das HPr-Ser-P stellt den Effektor für den pleiotropen Transkriptionsregulator CcpA (catabolite control protein A) dar. Die Bindung von HPr-Ser-P an das CcpA-Protein erlaubt es diesem Regulator als Dimer an die *cre*-Sequenz (catabolite responsive element) zu binden. Die *cre*-Sequenz ist dabei eine Operatorstelle, die sich vor den meisten katabolischen Transkriptionseinheiten in Gram-positiven Bakterien befindet. Daher kann die Transkription von katabolischen Genen reprimiert werden, welche für die Aufnahme anderer C-Quellen notwendig sind (Görke und Stülke, 2008; Titgemeyer und Hillen, 2002). Unter Bedingungen des Nährstoffmangels, d. h. bei geringen intrazellulären FBP- und ATP-Konzentrationen, sowie einem hohen Gehalt an anorganischem Phosphat (P_i), verändert die HPrK/P ihre Aktivität und dephosphoryliert HPr-Ser-P wieder (Mijakovic *et al.*, 2002).

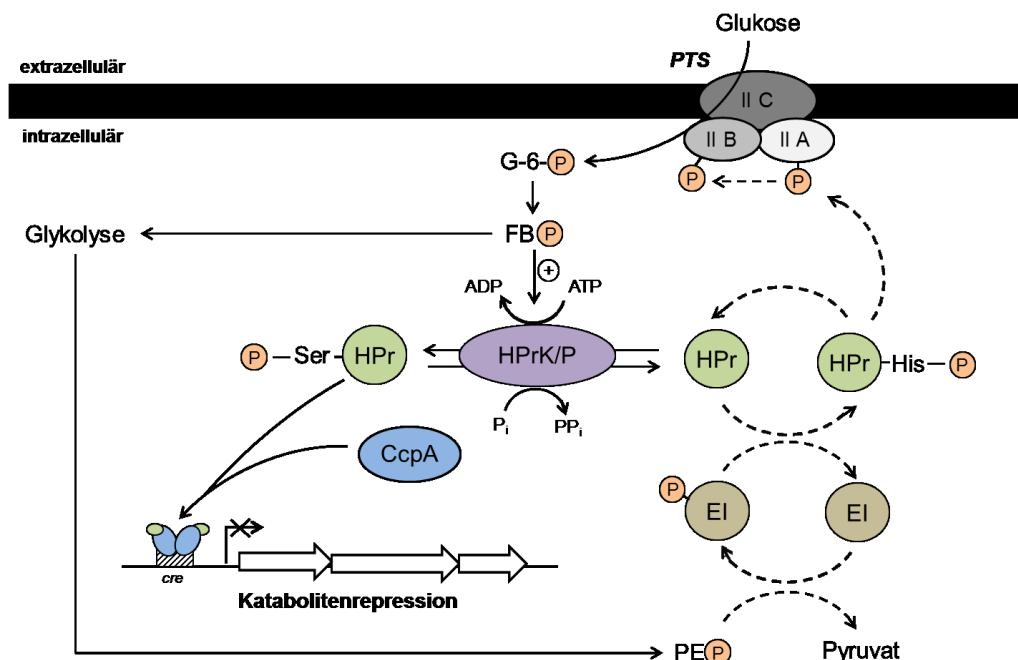


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Katabolitenrepression (CCR) in Gram-positiven Bakterien (Görke und Stülke, 2008; mod.). Das HPr kann am Ser-46-Rest durch die HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrK/P) phosphoryliert werden. Dies erfolgt, wenn hohe intrazelluläre Konzentrationen an Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP) und ATP vorliegen, die die Anwesenheit einer bevorzugten C-Quelle (in diesem Fall Glukose) widerspiegeln. HPr-Ser-P bindet zusammen mit dem Transkriptionsregulator CcpA, an die *cre*-Bindestellen und ermöglicht somit die Repression anderer katabolischer Gene. HPrK/P ist auch für die Dephosphorylierung von HPr-Ser-P verantwortlich, wenn die intrazellulären Konzentrationen von FBP und ATP niedrig sind und viel anorganisches Phosphat (P_i) vorliegt

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

In den nachfolgenden Tabellen sind die während dieser Arbeit verwendeten Organismen (Tab. 2.1), Vektoren (Tab. 2.2) und rekombinanten Plasmide (Tab. 2.3) aufgeführt.

Tab. 2.1: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Typstamm	Laborsammlung #258
<i>C. acetobutylicum</i> <i>manI::int</i> (198)	Gruppe II Intron integrierte zw. 198./199. Bp von <i>cac1457</i> , Erm ^R	Laborsammlung #455 Diese Arbeit
<i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fru</i> (<i>fru</i>)	Deletion des <i>fru</i> -Operons (CAC0231-CAC0234), Mls ^R	Laborsammlung #456 Diese Arbeit
<i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fru_compl</i>	Deletion des <i>fru</i> -operons (CAC0231-CAC0234), Mls ^R , pT <i>fru</i> -catP, Cm ^R	Laborsammlung #457 Diese Arbeit
<i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>manII</i> (<i>manII</i>)	Deletion des <i>manII</i> -operons (CAP0066-CAP0068), Mls ^R	Laborsammlung #458 Diese Arbeit
<i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fruR</i> (<i>fruR</i>)	Deletion von <i>fruR</i> (CAC0231), Mls ^R	Laborsammlung #459 Diese Arbeit
<i>C. acetobutylicum</i> Δ <i>fruR_compl</i>	Deletion von <i>fruR</i> (CAC0231), Mls ^R , pT <i>fru</i> -catP, Cm ^R	Laborsammlung #460 Diese Arbeit
<i>C. acetobutylicum</i> pT \cdot <i>fruR</i>	pTHydA \cdot <i>fruR</i> (C-term. Strep-tag); Em ^R , Amp ^R	Laborsammlung #461 Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , (φ 8 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Laborsammlung # 272 Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> DH5 α pT \cdot <i>fruR</i> -catP	pT \cdot <i>fruR</i> (C-term. Strep-tag); Em ^R , Amp ^R	Laborsammlung #462 Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 α pT \cdot <i>ccpA</i> -catP	pT \cdot <i>ccpA</i> (C-term. Strep-tag); Em ^R , Amp ^R	Laborsammlung #463 Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ER2275	<i>mcrA</i> , <i>mcrBC</i> , <i>hsdR</i> , <i>recA1</i>	Laborsammlung #271 Mermelstein und Papoutsakis, 1993

Tab. 2.2: Vektoren

Vektor	Relevantes Merkmal	Herkunft/Referenz
pANII	Tc ^R , Φ 3t1; p15A oriR	Laborsammlung #271 Heap <i>et al.</i> , 2007
pMTL007C-E2	<i>Cspfdx</i> , ErmRAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2-Terminator, <i>pCB102</i> , <i>catP</i> , ColE1, <i>lacZalpha</i> , <i>oriT</i> , Cm ^R	Laborsammlung #20 Heap <i>et al.</i> , 2007

pMTL007C	<i>fac</i> , ClosTron- ErmRAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2-Terminator, <i>pCB102</i> , <i>catP</i> , ColE1, <i>lacI</i> , <i>oriT</i>	Laborsammlung #19 Heap <i>et al.</i> , 2007
pCons:: <i>upp</i>	<i>upp</i> , Cm ^R , repL, ColE1	Laborsammlung #426 Soucaille <i>et al.</i> , 2006
pThydA	<i>thlA</i> Promotor, <i>hydA</i> , Strep-Tag II, AmpR, EmR, <i>repL</i> , ColE1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Laborsammlung #22 Girbal <i>et al.</i> , 2005
pThydA-catP	<i>thlA</i> Promotor, <i>hydA</i> , Strep-Tag II, Amp ^R , Cm ^R , <i>repL</i> , ColE1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Laborsammlung #397 Schulz, 2013

Tab. 2.3: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pMTL007C:: <i>cac1457</i> _Intron	pMTL007C-E2, <i>cac1457</i> _Intron, HindIII, BsrGI	diese Arbeit
pCons:: <i>fru</i>	<i>fru</i> , <i>upp</i> , Cm ^R , Mls ^R , repL, ColE1 ori	diese Arbeit
pCons:: <i>manII</i>	<i>manII</i> , <i>upp</i> , Cm ^R , Mls ^R , repL, ColE1 ori	diese Arbeit
pT:: <i>fruR</i>	<i>thlA</i> Promotor, <i>fruR</i> , Strep-Tag II, Amp ^R , Erm ^R , repL, ColE1 ori	diese Arbeit
pT:: <i>fru</i> -catP	<i>thlA</i> Promotor, <i>fru</i> , Strep-Tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	diese Arbeit
pT:: <i>fruR</i> -catP	<i>thlA</i> Promotor, <i>fruR</i> , Strep-Tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	diese Arbeit
pT:: <i>ccpA</i> -catP	<i>thlA</i> Promotor, <i>ccpA</i> , Strep-Tag II, Amp ^R , Cm ^R , repL, ColE1 ori	diese Arbeit

2.2 Oligonukleotide (Primer)

Die Tabelle 2.4 umfasst alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 2.4: Oligonukleotide

Primername	Sequenz (5' → 3')	Tm (°C)
EBS Universal	CGAAATTAGAAACTTGCCTTCAGTAAC	60,7
cac1457-198 199s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAATTCTCTCGGAGTGCG-CCAGATAGGGTG	65,2
cac1457-198 199s-EBS1d	CAGATTGTACAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTCGGA-GATAACTTACCTTCTTTGT	65,0
cac1457-198 199s-EBS2	TGAACGCAAGTTCTAATTCGGTTAGAATCCGATAGAGG-AAAGTGTCT	65,1

P1_bamHI_fw	aaaaaaGGATCCCAAGGGTTGAAACTCAATTAA	49,3
P2_StuI_operon	ggggAGGCCTaaaaaggggCACCTTCATATATTG-CG	50,4
P3_StuI_operon	cccccttttAGGCCTccccGAATGTTGCTAATAGCAGC	49,0
P4_BamHI_operon	aaaaaaGGATCCGTTACCACCCTTTAACTTTATAG	50,0
P5_operon_rev	GCTGTTAGGAAACTTCCTTG	51,7
P2_StuI_0231	ggggAGGCCTaaaaaggggCTTTGCCTTCTTCTGC	49,9
P3_StuI_0231	cccccttttAGGCCTccccGATTTAAAGATTGGGAGTACAA	49,5
P4_BamHI_0231	aaaaaaGGATCCCCTCCTCAATAACTACACTTT	49,4
P1_0066_bamHI	aaaaaaGGATCCGGGCTTAGGAACAGCTATTAATA	52,0
P2_0066_stuI	ggggAGGCCTaaaaaggggGTTCTGGAAAACCTGTAACCAA	53,2
P3_0068_stuI	cccccttttAGGCCTccccCTTACTTAGCCTGGCTTTG	53,3
P4_0068_bamHI	aaaaaaGGATCCGATGGCATAGCTTATAACATTAAGC	51,8
mlsR_fw	CCTGGGATGTAACGCACTGAG	57,8
mlsR_rev	CCTTGAGCGATTGTGTAGGCTG	58,1
cap0067_fw	GTGACTCTAAATATAATTCAAATGG	48,1
cap0067_rev	TTAGTATCTATCGATAATATCGCC	49,3
cac1457_fw	GTGACTCTAAATATAATTCAAATGG	48,1
cac1457_rev	TTAGTATCTATCGATAATATCGCC	49,3
P1_1457_bamHI	aaaaaaGGATCCGAATAATGGTTATCAGGTGACTTC	51,4
P4_1460_bamHI	aaaaaaGGATCCCTGAATTAGTTGTATAAAATGCAACC	51,2
ErmRAM_fw	ACCGGTTATATTGATAAAAATAATAATAGTGGG	54,5
ErmRAM_rev	ACCGGTGCGACTCATAGAATTATTCCTCCCG	64,1
Eub_fw	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	52,9
Eub_rev	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	56,7
cac0231_fw_BglII	aaaaaaAGATCTATGTTGCAGAAGAAAGG	47,7
cac0234_rev_Cfr9I	aaaaaaCCCGGGTTTCTTACTATGTCTTCTTAAAG	48,0
Cac1457_fw	ATGAGATATGTAATATTAGTAAGTC	45,8
Cac1457_rev	CTAAATATCATCTTCCTTATCTG	46,1
cac0231_fw_BamHI	AAAAAA GGATCC ATGTTGCAGAAGAAAGGC	51,2
cac0231_rev_Cfr9I	AAAAAA CC CGGG TGCGACT ATTATTTGTACTCC	50,5

ccpA_fw_BamHI	AAAAA GGATCC ATGGCTGCCTCTATTAAAG	49,4
ccpA_rev_CfR9I	AAAAA CCCGGG TTTACATGAATCTCTCAATTATATTG	49,9
0231_race_147_rev	GAGAACCTTCTATCTTCC	46,3
0231_race_322_rev	CTATTTCAAGAGTAGTTATATCAATTG	46,1
0231_race_192_rev	CCTCAAAATTAGTTATATCAATTG	46,1
BS_xylB_fw	TTGTTGTAGGTGGAGGAG	50
BS_xylB_rev	CACAATCAAACCCCTAA	50,1
BS_fruR_fw	AGAGAGTGGTTTGTTGG	48,9
BS_fruR_rev	TGCAAACATATAATCACCTTC	49,6

¹ Grüne Basen sind Restriktionsschnittstellen; unterstrichene Basen zeigen genspezifische Veränderungen der ursprünglichen Primersequenzen

² T_m-Berechnung mittels OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>)

2.3 Nährmedien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien wurden nach ihrer Herstellung bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 2,1 bar für 20 min autoklaviert, sofern dies nicht anders vermerkt ist.

2.3.1 Medium für *E. coli*

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; Sambrook und Russel, 2001)

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

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

2.3.2 Medium für *C. acetobutylicum*

Die anaeroben Nährmedien für *C. acetobutylicum* wurden nach Breznak und Costilow (1994) hergestellt. Im Anschluss erfolgte ein Aufkochen der Flüssigmedien in der Mikrowelle und deren Abkühlen unter Stickstoffbegasung. Dadurch wurde der gelöste Sauerstoff aus den Medien getrieben, was anhand eines Farbumschlags des Redoxindikators Resazurin (Endkonzentration im Medium 0,0001 % [w/v]) erkennbar war. Eventuell vorhandener Restsauerstoff konnte durch Zutropfen von Titan-III-NTA (2.3.3) reduziert werden.

Für die Herstellung anaerober Medienplatten wurden diese aerob gegossen und drei Tage vor Gebrauch in die Anaeroben-Werkbank (MACS-MG-1000-anaerobic workstation, meintrup dws Laborgeräte, Lähden-Holte) eingeschleust. Die Medienplatten enthielten kein Resazurin. Dennoch erfolgte regelmäßig eine Kontrolle der Sauerstoffkonzentration mit Indikatorpapier (Anaerobic Indicator BR55, Oxoid, Wesel).

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

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

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

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

C-Quelle	60	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22	g
KH ₂ PO ₄	0,55	g
K ₂ HPO ₄	0,55	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	11	mg
Essigsäure (konz.)	2,3	ml
PABA (8 mg/l) ¹	5	ml
Biotin (0,08 mg/l) ¹	4	ml
MES	21,3	g
Resazurin (0,1 %, [w/v])	1	ml
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

¹ Diese Komponenten wurden entweder aus einer 100x Stammlösung (PABA) bzw. aus einer 1000x Stammlösung (Biotin) vor dem Autoklavieren zugegeben.

Vor der Zugabe von MES wurde der pH-Wert mit NH₄OH auf 6,6 eingestellt. Für die Herstellung von MS-MES mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (C-Quelle) wurde das Medium wie beschrieben hergestellt, allerdings ohne den Zusatz von Glukose. Stattdessen wurde vor der Inokulation die jeweilige C-Quelle aus einer anaeroben, filtersterilisierten Stammlösung (Glukose (60% [w/v]), Fruktose (60% [w/v]), Mannose (50% [w/v])) hinzugegeben.

RCA (reinforced clostridial agar)

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

Der pH-Wert betrug ohne Einstellung etwa 6,8 und wurde bereits als fertiges Gemisch kommerziell von der Firma Oxoid (Wesel) erworben.

2.3.3 Medienzusätze

Medienzusätze wurden als Stammlösungen hergestellt und den unter 2.3.1 und 2.3.2 aufgeführten Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen (max. 60 °C) im Bedarfsfall hinzugegeben. Die einzelnen Stammlösungen und die finalen Konzentrationen für *C. acetobutylicum* und *E. coli* können der Tabelle 2.5 entnommen werden.

Tab. 2.5: Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]	
		<i>C. acetobutylicum</i>	<i>E. coli</i>
Ampicillin	50 in <i>A. dest.</i> ¹	-	100
Chloramphenicol	34 in Ethanol (96 % [v/v]) ²	-	25
Erythromycin	50 in Ethanol (96 % [v/v]) ²	20	200
Tetracyclin	10 in Ethanol (50 % [v/v]) ²	-	10
Thiamphenicol	15 in Ethanol (96 % [v/v]) ²	15	-
X-Gal	20 in DMF	-	40

¹ sterilfiltriert, Porengröße 0,2 µm (Sterilfilter, Schleicher&Schuell)² in Ethanol gelöste Substanzen müssen nicht sterilfiltriert werden**Titan-(III)-NTA-Lösung**

Für die Herstellung der Titan-(III)-NTA-Lösung wurde die Nitrilotriessigsäure (NTA) zunächst in 30 ml *A. dest.* und 20 ml 5 M NaOH gelöst und anschließend mit Stickstoff durchgast, um vorhandenen Sauerstoff zu entfernen. In der Anaeroben-Werkbank erfolgte unter ständigem Schütteln der Müller&Krempel-Serumflasche die gleichzeitige

Zugabe von 15 %iger (w/v) TiCl_3 - und 2 M Na_2CO_3 -Lösung. Nach dem Auffüllen der Titan-(III)-NTA-Lösung mit anaerobem *A. dest.* auf 75 ml wurde diese steril filtriert.

Nitrilotriessigsäure	5,73	g
NaOH (5 M) ¹	20	ml
TiCl_3 -Lösung (15 % [w/v])	6,4	ml
Na_2CO_3 (2 M) ¹	10	ml
<i>A. dest.</i> ¹ <i>ad</i>	75	ml

¹Diese Komponenten wurden vor ihrer Verwendung mittels N_2 -Durchgasung anaerobisiert.

2.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Die Konservierung von *E. coli*-Stämmen konnte über einen Zeitraum von maximal sechs Wochen auf LB-Agar (2.3.1) erfolgen. Zur dauerhaften Stammhaltung wurde 1 ml einer exponentiell gewachsenen Kultur mit 0,5 ml LB-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) versetzt, anschließend gründlich durchmischt und bei -70 °C gelagert.

Die Stammhaltung von *C. acetobutylicum* als Sporensuspension erfolgte in MS-MES (2.3.2). Dafür wurden die Kulturen bis zur Sporulation der Zellen bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen kultiviert und anschließend bei -20 °C gelagert. Für eine längerfristige Lagerung der Sporensuspensionen wurden Stammkulturen angelegt, die bei -70 °C verwahrt wurden. Alternativ zur Sporensuspension konnten *C. acetobutylicum* Stämme durch die Zugabe von 0,5 ml einer anaeroben CGM-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], CGM-Medium ohne Glukose 40 % [v/v]) zu 1 ml exponentiell wachsenden Zellen in 2 ml Schraubdeckelröhrchen bei -70 °C konserviert werden.

Regelmäßiges Ausplattieren auf entsprechendem Festmedium diente der Vitalitätskontrolle dieser Stammkulturen. Sowohl die mikroskopische Überprüfung auf eine einheitliche Zellmorphologie, als auch die regelmäßige Durchführung von Reinheitsausstrichen gewährleistete die Reinheit der Stammkulturen.

2.5 Zellanzucht

2.5.1 Zellanzucht von *E. coli*

Während die Zellanzucht von *E. coli* auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Brutschrank erfolgte, wurden die LB-Flüssigkulturen (2.3.1) bei 180 Upm und 37 °C im Schüttler inkubiert, um eine optimale Sauerstoffzufuhr zu ermöglichen.

2.5.2 Zellanzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium

Für die Anzucht von *C. acetobutylicum* wurden RCA-Platten (siehe 2.3.2) bei 37 °C in einer Anaeroben-Werkbank unter Stickstoffatmosphäre verwendet. Zur Reduktion von eingetragenem Sauerstoff wurde eine maximale Konzentration von 5 % [v/v] Wasserstoff zugegeben.

2.5.3 Zellanzucht von *C. acetobutylicum* in statischer Kultur

Die Anzucht von *C. acetobutylicum*-Batch-Kulturen erfolgte anaerob unter abgeschlossener Stickstoffatmosphäre bei 37 °C in Hungate-Röhrchen oder Müller&Krempel-Serumflaschen. Dabei dienten 0,1 Vol. einer MS-MES-Sporensuspension bzw. 1 ml einer CGM-Glycerin-Stammkultur (2.4) als Inokulum einer 10-ml-CGM-Batch-Kultur. Bei Verwendung einer Sporensuspension wurden die Sporen durch Pasteurisierung (10 min bei 80 °C) aktiviert. Nach dem Beimpfen folgte eine Inkubation bei 37 °C i.d.R. im Wasserbad für 15-24 h. Diese sogenannten Vorkulturen konnten zudem zur Inokulation von Batch-Hauptkulturen eingesetzt werden. Die Anzucht der Batch-Hauptkulturen erfolgte je nach vorgesehenem Zweck in Müller&Krempel-Serumflaschen unterschiedlicher Volumina und einer initialen optischen Dichte (OD₆₀₀) von ungefähr 0,1. Dabei war zu beachten, dass die Serumflaschen aufgrund des zu erwartenden Druckanstiegs durch Gasentwicklung bei Wachstum der Kulturen nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens befüllt wurden.

Hauptsächlich wurden die physiologischen Parameter in statischen 200-ml-MS-MES-Kulturen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Dafür schloss sich an die CGM-Vorkultur eine weitere Vorkultur in MS-MES an, die je nach Bedarf mit verschiedenen C-Quellen (Glukose, Fruktose, Mannose oder Mannitol) versetzt und für 12 h inkubiert wurde, bevor die Kultivierung in der Hauptkultur erfolgte.

2.6 Bestimmung physiologischer Parameter

2.6.1 Optische Dichte

Die optische Dichte (OD) dient als Wachstumsparameter für Flüssigkulturen und wurde zur Beurteilung des Zellwachstums bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektralphotometer (Spekol 1100; Analytik Jena AG, Jena) gegen einen Medienleerwert in einer

Plastikküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Bei Extinktionen über 0,3 erfolgte eine entsprechende Verdünnung der Zellsuspensionen mit *A. dest.*

2.6.2 Messung des pH-Wertes

Die Bestimmung des pH-Wertes von Flüssigkeiten erfolgte mit einem pH-Meter (WTW pH 526). Dafür sollten Proben aus Bakterienkulturen zunächst sedimentiert werden (16 000 x g, 4 °C, 10 min), um eine Verunreinigung des Diaphragmas der Elektrode zu verhindern.

2.6.3 Lichtmikroskopie

Zur Charakterisierung der Zellmorphologie analysierter Bakterienstämme wurde ein Hellfeldmikroskop (Olympus CHS-Mikroskop, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) verwendet. Die Analysen wurden bei 400facher Vergrößerung (Objektiv: A40LP) durchgeführt, in der Regel im Phasenkontrast.

2.6.4 Berechnung der Wachstumsrate und der Verdopplungszeit

Ermittelt wurde die Wachstumsrate (μ), die die massenabhängige Verdopplung pro Stunde anzeigt. Daraus resultierend kann die Verdopplungszeit (t_d) berechnet werden, das Zeitintervall der Zellmasseverdopplung pro Stunde.

$$[1] \quad \mu = \frac{\log x_2 - \log x_1}{\log e x (t_2 - t_1)}$$

Formel 1: Wachstumsrate (μ): x_2 und x_1 sind die Messwerte der optischen Dichte zu den Zeitpunkten t_2 und t_1 .

$$[2] \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Formel 2: Verdopplungszeit (t_d): μ ist die Wachstumsrate [1].

2.6.5 Gaschromatographie

Für die Analyse und Quantifizierung der flüssigen Gärungsprodukte Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol und Butanol wurde ein Agilent 7890A Gaschromatograph (Agilent Technologies, Böblingen) unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID) einge-

setzt, wie bei Scheel (2012) beschrieben. Als Trägergas diente Stickstoff, welches über einen Feuchtigkeitsfilter und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde. Neben Wasser und Sauerstoff konnten dadurch auch schweflige und chlorierte Substanzreste zurückgehalten werden. Die eingesetzten FID-Brenngase, synthetische Luft und Wasserstoff, wurden zur Entfernung organischer Substanzen über einen Aktivkohlefilter geführt. Der Einsatz einer mit Chromosorb 101 (80-100 mesh) gepackten Säule erlaubte die Analyse sowohl von Alkoholen als auch von Carbonsäuren.

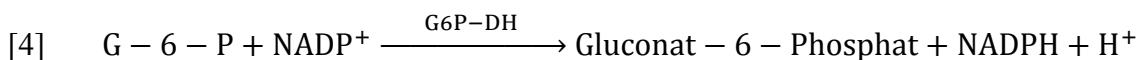
Zur Quantifizierung des jeweiligen Produktspektrums wurden die Zellsuspensionen sedimentiert ($13\ 000 \times g$, $4\ ^\circ C$, 10 min) und bis zur Untersuchung bei $-20\ ^\circ C$ gelagert.

2.6.6 Optisch-enzymatische Kohlenhydrat-Bestimmung

Die Quantifizierung der im Medium vorhandenen Menge an jeweiliger Kohlenstoffquelle erfolgte durch einen optisch-enzymatischen Assay, der photometrisch (Ultrospec 3000) bei einer Wellenlänge von 340 nm durchgeführt wurde. Dafür wurden die Proben zunächst sedimentiert ($13\ 000 \times g$, $4\ ^\circ C$, 10 min) und konnten bis zur Messung bei $-20\ ^\circ C$ gelagert werden.

D-Glukose

Die Bestimmung der Konzentration an D-Glukose im Medium erfolgte nach Bergmeyer (1983) und wurde durch Wietzke (2013) beschrieben. Dabei wird D-Glukose in zwei Reaktionsschritten zu Gluconat-6-Phosphat umgesetzt:



Formel 3-4: Optisch-enzymatische Glukosebestimmung in zwei Reaktionsschritten. HK, Hexokinase [EC 2.7.1.1]; G-6-P, Glukose-6-Phosphat; G6P-DH, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [EC 1.1.1.49].

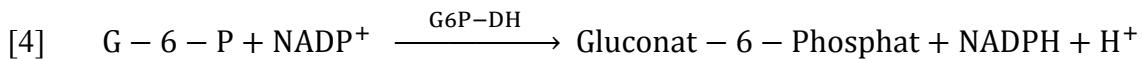
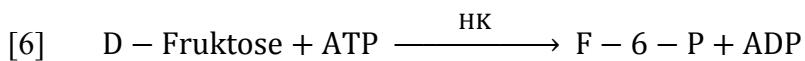
Die gebildete Menge an NADPH ist dabei stöchiometrisch zur Menge an eingesetzter Glukose. Das NADPH wird durch eine Zunahme der Extinktion bei 340 nm gemessen. Mit Hilfe folgender Gleichung kann die Konzentration an Glukose der Probe berechnet werden:

$$[5] \quad c_{\text{Glukose}} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot MW_{\text{Glukose}}}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot VF \left[\frac{g}{l} \right]$$

Formel 5: Berechnung der Glukosekonzentration. c, Konzentration; ΔE , Extinktionsänderung; V, Gesamtvolumen des Ansatzes; MW, Molekulargewicht (180,16 [g/mol]); ε , Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm ($6300 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); d, Schichtdicke (1 cm); v, Probenvolumen.

D-Fruktose

Die Bestimmung der Fruktosekonzentration im Medium wurde mit dem kommerziell erhältlichen Kit K-FRUGL der Firma Megazyme (Wicklow, Ireland) durchgeführt. Mit diesem Kit ist es möglich D-Glukose und D-Fruktose in einem Ansatz unabhängig voneinander zu bestimmen. Der Umsatz von D-Fruktose zu Gluconat-6-Phosphat erfolgt in drei Reaktionsschritten:



Formel 4, 6-7: Optisch-enzymatische Fruktosebestimmung in drei Reaktionsschritten. HK, Hexokinase [EC 2.7.1.1]; F-6-P, Fruktose-6-Phosphat; PGI, Phosphoglukose Isomerase [EC 5.3.1.9]; G-6-P, Glukose-6-Phosphat; G6P-DH, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [EC 1.1.1.49].

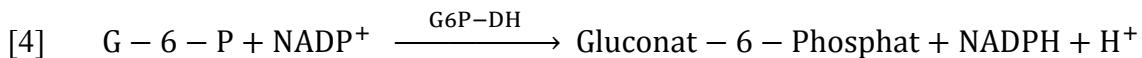
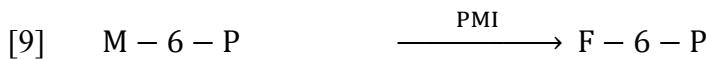
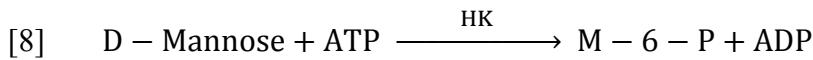
Nach Beendigung der Reaktion [6] kann Fructose-6-Phosphat durch die Phosphoglukose Isomerase zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt werden [7].

Das entstandene Glucose-6-Phosphat wiederum reagiert mit NADP^+ zu Gluconat-6-Phosphat und NADPH [8], was mit einem erneuten Anstieg der Absorption einhergeht, der stöchiometrisch zu der Menge an D-Fruktose ist. Die Messung der Fruktosekonzentration erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei allerdings nur jeweils die Hälfte der angegebenen Menge verwendet wurde. Die Berechnung der Fruktosekonzentration erfolgt wie unter Formel [5] beschrieben. Das Molekulargewicht für Fruktose ist mit dem von Glukose identisch.

D-Mannose

Die Bestimmung der Mannosekonzentration im Medium wurde mit dem kommerziell erhältlichen Kit K-MANGL der Firma Megazyme (Wicklow, Ireland) durchgeführt. Mit

diesem Kit ist es möglich D-Glukose, D-Fruktose und D-Mannose in einem Ansatz unabhängig voneinander zu bestimmen. Der Umsatz der D-Mannose zu letztlich Gluconat-6-Phosphat erfolgt in vier Reaktionsschritten:



Formel 4, 7-9: Optisch-enzymatische Mannosebestimmung in vier Reaktionsschritten. HK, Hexokinase [EC 2.7.1.1]; M-6-P, Mannose-6-Phosphat; PMI, Phosphomannose Isomerase [EC 5.3.1.8]; F-6-P, Fruktose-6-Phosphat; PGI, Phosphoglukose Isomerase [EC 5.3.1.9]; G-6-P, Glukose-6-Phosphat; G6P-DH, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [EC 1.1.1.49].

Die Probenvorbereitung erfolgt analog zur Bestimmung der Fruktosekonzentration. Auch das Protokoll für die Messung ist ähnlich zu dem für die Fruktosemessung und kann der mitgelieferten Anleitung des Herstellers entnommen werden. Auch hierbei wurde das Volumen der jeweiligen Ansätze halbiert. Die Berechnung der Mannosekonzentration erfolgt wie unter Formel [5] beschrieben. Das Molekulargewicht für Mannose ist mit dem für Glukose identisch.

2.7. Isolierung von Nukleinsäuren

2.7.1 Plasmid-Minipräparation aus *E. coli*

Zur Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen, wurde das Standardprotokoll der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) angewandt. Der Gewinnung von Plasmid-DNA dienten in der Regel 4 ml einer Übernachtkultur, die nach dem Protokoll wie bei Voigt (2010) beschrieben, behandelt wurden.

2.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* wurden 50 ml CGM (2.3.2) mit 10 % (v/v) Zellsuspension einer entsprechenden Vorkultur inkuliert und bis

zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 6.000 x g, 4 °C; Sorvall RC 6⁺; Rotor SLA-3000) sedimentiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, auf zwei 2-ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und diese bei -20 °C eingefroren. Die Isolation der chromosomalen DNA erfolgte in modifizierter Form nach Bertram (1989) und ist der Arbeit von Voigt (2010) zu entnehmen.

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

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte nach Oelmüller *et al.* (1990; mod.). Von der Kultur wurden 30-ml-Proben entnommen, zentrifugiert (1 min, 16.000 x g, 4 °C), die entstandenen Pellets sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und daraufhin bei -70 °C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde mittels Phenol-Extraktion nach dem Protokoll aus der Arbeit von Janssen (2010) isoliert.

2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Zur Vermeidung von Verunreinigungen wurden alle Geräte und Lösungen für die Arbeit mit Nukleinsäuren einer Vorbehandlung unterzogen. Hitzestabile Lösungen und Geräte wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert, wohingegen hitzelabile Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm; Sarstedt) wurden. Die Desinfektion von Arbeitsflächen und hitzelabilen Gebrauchsgegenständen erfolgte mit Ethanol (70 % [v/v]).

Alle für den Umgang mit RNA benötigten Lösungen und Materialien wurden zweimal autoklaviert. Die Geräte sowie der Arbeitsplatz wurden zusätzlich mit RNase-ExitusPlus™ (AppliChem, Darmstadt) gesäubert. Eine zusätzliche Kontamination mit unspezifischen RNasen sollte durch das Tragen von ebenso behandelten Einweghandschuhen minimiert werden.

2.8.1 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.1.1 Restriktion von DNA

Der Restriktionsverdau der DNA erfolgte in dem vom jeweiligen Hersteller des Enzyms mitgelieferten empfohlenen Puffer und mit einem Mindestvolumen von 10 µl für die Restriktion von 1 µg DNA. Die sequenzspezifische Hydrolyse von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurde in der Regel für 2-14 h, im Falle von chromosomaler DNA für bis zu

24 h bei 37 °C durchgeführt. Bei Kontrollrestriktionen (10 µl Ansatz) wurde die Reaktion durch Zugabe von 6x Loading Dye beendet, andernfalls wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung gemäß den Angaben des Herstellers gestoppt. In der Tabelle 2.6 sind alle während dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme, sowie deren Erkennungssequenzen und Puffer aufgeführt.

Tab. 2.6: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz ¹	Puffersystem
<i>BamHI</i>	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-5'	10x BamHI 10x Tango™
<i>BglII</i>	5'-A↓GATCC-3' 3'-TCTAG↑A-5'	10x Puffer O
<i>BcuI (SpeI)</i>	5'-A↓CTAGT-3' 3'-TGATC↑A-5'	10x Tango™
<i>Bsp1407I (BsrGI)</i>	5'-T↓GTACA-3' 3'-TGTAC↑A-5'	10x Tango™
<i>Bsu15I (ClaI)</i>	5'-AT↓CGAT-3' 3'-TAGC↑TA-5'	10x Tango™
<i>CfR9I (XmaI)</i>	5'-C↓CCGGG-3' 3'-GGGCC↑C-5'	10x Cfr9
<i>Eco147I (StuI)</i>	5'-AGG↓CCT-3' 3'-TCC↑GGA-5'	10x Puffer G 10x Tango™
<i>HhaI</i>	5'-GCG↓C-3' 3'-CGC↑G-5'	10x Tango™
<i>HindIII</i>	5'-A↓AGCTT-3' 3'-TTCGA↑A-5'	10x Puffer R 10x Tango™
<i>NcoI</i>	5'-C↓CATGG-3' 3'-GGTAC↑C-5'	10x Tango™
<i>PsuI (BstYI, XhoII)</i>	5'-R↓GACTY-3' 3'-YTCAG↑R-5'	10x Puffer B
<i>SatI (Fnu4HI)</i>	5'-GC↓NGC-3' 3'-CGN↑CG-5'	10x Puffer G 10x Tango™

¹ N = A, T, C oder G; R = A oder G; Y = C oder T; ↓↑ = Restriktionsschnittstelle

2.8.1.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Linearisierte Vektoren wurden mit Hilfe der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Fermentas) nach den Angaben des Herstellers an ihren 5'-Enden dephosphoryliert, um deren Selbstligation zu unterbinden (Sambrook und Russel, 2001). Nach 20-minütiger Inkubation bei 37 °C und erfolgter Hitzeinaktivierung bei 80 °C für 10 min wurden die Ansätze mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Schwerte) anschließend aufgereinigt, um Pufferrückstände zu entfernen.

2.8.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine effiziente Ligation wurden zunächst die Konzentrationen der zu ligierenden Fragmente bestimmt. Im Ligationsansatz wurden Vektor und Insert i. d. R. in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Das Standardvolumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl, wobei die T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) mit einer Konzentration von 1 U/µl im entsprechenden Reaktionspuffer dem Ansatz beigegeben wurde. Der Ligationsansatz wurde entweder für 60 min bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Im Anschluss konnten die ligierten Fragmente direkt für die Transformation (2.9.1) eingesetzt werden.

2.8.3 Reinigung von Nukleinsäuren

2.8.3.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte, Vektor-DNA) aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) genutzt. Die zu extrahierende DNA-Bande wurde nach Färbung im Ethidiumbromidbad aus 0,8 – 2 % Agarosegelen unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend gemäß den Angaben des Herstellers, unter Verwendung entsprechender Puffer, behandelt. Abschließend erfolgte eine Kontrolle mittels Gelelektrophorese (2.7.4).

2.8.3.2 Kit-basierte DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen oder nach Restriktionsendonuklease-Behandlung erfolgte mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Schwerte) mit den Puffern und nach den Angaben des Herstellers.

2.8.4 Agarosegelektrophorese (Sambrook und Russel, 2001)

2.8.4.1 Standard-Gelektrophorese

Die nicht-denaturierende Agarosegelektrophorese zum Zweck der Analyse und Präparation erfolgte in horizontalen Agarosegelen im 1x TAE-Puffersystem. In Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente variierte die Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 2 % (w/v). Die RNA-Agarosegelektrophorese (2.7.4.2) fand mit steriler Agarose und sterilem Laufpuffer statt. Um die Lauffront zu markieren und ein möglichst komplettes Einsinken der Proben zu gewährleisten, wurden diese mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt. Zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren fanden Längenstandards der Firma Thermo Scientific Anwendung. Die Auf trennung der Nukleinsäurefragmente erfolgte i. d. R. bei einer konstanten Spannung von 70-90 V. Nach Inkubation des Gels im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml in *A. dest.*) konnten die Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einer Photodokumentationsanlage (Gelprint 2000; MWG-Biotech, Ebersberg) visualisiert und dokumentiert werden.

50x TAE (Sambrook und Russel, 2001)

Tris	242	g
Essigsäure (konz.)	57	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100	ml
<i>A. dest.</i>	ad	1000 ml

Das Einstellen von pH 7,5 erfolgte mit 0,1 M HCl.

6x Loading Dye

Bromphenolblau	125	mg	0,25 % [w/v]
Xylencyanol	125	mg	0,25 % [w/v]
Glycerin (86 % [v/v])	15	ml	30 % [v/v]
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	5	ml	50 mM
<i>A. dest.</i>	ad	50	ml

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.8.4.2 Denaturierende Gelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001; mod.)

Um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden, wurde bei der Northern Hybridisierung (2.8.7.5) verwendete RNA unter denaturierenden Bedingungen im Agarosegel aufgetrennt. Die Zugabe von Formaldehyd und Formamid zu den RNA-Proben sowie

Formaldehyd zum Laufpuffer und Agarosegel verhinderte während der Auftrennung die Ausbildung intramolekularer Basenpaarung.

Die RNA-Proben (0,5-20 µg) wurden mit 0,2 Vol. RNA-Auftragspuffer versetzt, für 10 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis überführt, kurz anzentrifugiert und mit 4 µl Längenstandard aufgetragen. Unter einer konstanten Spannung von 70 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in 1x Laufpuffer.

10x Laufpuffer

MOPS	41,8	g
Na ₂ Acetat x 3 H ₂ O	6,8	g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	3,7	g
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf 7 eingestellt.

1x Laufpuffer

10 x Laufpuffer	50	ml
<i>A. dest.</i>	440	ml
Formaldehyd	8,2	ml

Das Formaldehyd wurde nach dem Autoklavieren zugesetzt.

RNA-Auftragspuffer

Bromphenolblau	20	mg
1x Laufpuffer	25	ml
Glycerin	25	ml
EDTA (0,5 M; pH 8)	10	µl

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden 200 µl des autoklavierten Puffers mit 24 µl Formaldehyd (37 % [v/v]) und 109 µl Formamid gemischt.

Denaturierendes Agarosegel (1,5 % [w/v])

Agarose	0,45	g
<i>A. dest.</i>	26,6	ml
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,54	ml
10x Laufpuffer	3	ml

Nach dem Autoklavieren und der Abkühlung der Agaroselösung auf 60 °C erfolgte die Zugabe des Formaldehyds und des 10x Laufpuffers.

2.8.5 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen in wässrigen Lösungen konnte photometrisch (Ultrospec 3000; Amersham) durch die Messung der Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten erfolgen. Die Proben wurden dabei i. d. R. mit destilliertem Wasser oder TE-Puffer verdünnt. Bei einer OD₂₆₀ von 1 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt (Sambrook und Russell, 2001). Die Rein-

heit der DNA-Lösung ließ sich aus der Ratio (Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀) abschätzen. Für reine DNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8 (Sambrook und Russell, 2001). Zur Konzentrationsbestimmung von isolierter RNA wurden die Proben 1:200 bzw. 1:400 verdünnt. Hierbei deutet eine Ratio zwischen 1,7 und 2 auf eine reine Lösung hin. Eine weitere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren stellt die Überprüfung im Agarosegel (2.8.4.1) dar. Die Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration im Gel erfolgte durch Auf trennung der DNA-Fragmente parallel zu einem Marker (MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use, Thermo Scientific) mit Fragmenten bekannter Konzentrationen. Die Ermittlung der Konzentration konnte dann visuell nach Ethidiumbromidfärbung im Vergleich zur Marker konzentration erfolgen.

2.8.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde gezielt eingesetzt, um Fragmente für Klonierungen und zur Herstellung von Sonden zu gewinnen, sowie zur Verifikation positiver Klone. Die Amplifikation fand in Thermocyclern mit Deckelbeheizung (PCR-Cycler, Biometra) statt. Für Standard-PCRs wurde die peqGold Pwo-Polymerase (PeqLab, Erlangen) genutzt. Um Fragmente mit einer Größe von mehr als 2 kBp zu amplifizieren, wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermon Scientific, Schwerte) verwendet.

2.8.6.1 Primerdesign

Für die Amplifikation von Zielsequenzen wurden zunächst Oligonukleotidprimer (Tab. 2.4) konstruiert. Mit Hilfe des OligoAnalyzers von IDT (www.eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) konnte sowohl die Schmelztemperatur berechnet werden, als auch die Möglichkeit der Ausbildung von Homo- und Heterodimeren überprüft werden. Nach Möglichkeit wurden bei der Konstruktion von zusammengehörigen fw- und rev-Primern auf eine ähnliche Schmelztemperatur geachtet.

2.8.6.2 Standard-PCR

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR setzte sich folgendermaßen zusammen:

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

Die PCR-Reaktion erfolgte gemäß folgendem Programm:

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

Für Amplifikationen unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase wurden ein spezifischer Reaktionsansatz und ein modifiziertes Programm verwendet:

Template	10-50	ng		
5x Phusion® HF-Puffer	5	µl		
dNTPs (10 mM)	1	µl		
Fw-Primer (10 µM)	2	µl		
Rev-Primer (10 µM)	2	µl		
Phusion®DNA Polymerase	1	µl		
<i>A. dest.</i>	ad	50	µl	
Denaturierung	98 °C	5	min	1 x
Denaturierung	98 °C	10	s	
Annealing	T _m (Primer)-3 °C	30	s	30 Zyklen
Elongation	72 °C	30 s / kBp Fragment		
Elongation	72 °C	10	min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	unendlich	

Anschließend wurden alle Ansätze mittels Gelelektrophorese kontrolliert (2.7.4.1).

2.8.6.3 Splicing by overlap extension - PCR (SOE-PCR) (Ho *et al.*, 1989)

Für die Insertionsmutagenese von *C. acetobutylicum* mittels des ClosTron®-Systems werden entsprechende Zielgene unter Verwendung eines mobilen Gruppe-II-Introns über eine Insertionsmutagenese verändert. Um das Gruppe-II-Intron an die Sequenz des Zielgens anzupassen, erfolgte die SOE-PCR. Im Zuge dieser SOE-PCR wurden drei an

das Zielgen angepasste Primer (IBS, EBS1d, EBS2) und ein unveränderter Primer (EBS Universal) gemeinsam in einer PCR-Reaktion eingesetzt. IBS- und EBS1d-Primer wurden im Überschuss eingesetzt, um eine verstärkte Bildung des an die Zielsequenz angepassten Introns (350 Bp) zu fördern. Die Oligonukleotide (Tab. 2.4) wurden zunächst auf die entsprechende Molarität verdünnt und dann zu einem „Vier-Primer-Mix“ vereinigt:

„Vier-Primer-Mix“

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

Als Template für den Reaktionsansatz diente zuvor isolierte Plasmid-DNA (2.7.1) des Vektors pMTL007C. Die PCR erfolgte nach Standardbedingungen (2.7.6.2) unter Verwendung von 2 µl des zuvor angesetzten „Vier Primer-Mix“ und mit einer Annealing-temperatur von 55 °C. Anschließend wurden alle Ansätze mittels Gelelektrophorese (2.7.4.1) aufgetrennt und durch eine Gel-Extraktion (2.7.3.5) aufgereinigt.

2.8.6.4 Fusions-PCR

Die Fusions-PCR ermöglicht die zielgerichtete Einführung von Basenveränderungen in einem Amplifikat. Dies erfolgte in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen, wobei im ersten Schritt zwei zu verbindende DNA-Fragmente mit Primern amplifiziert werden, die an ihren 3'-Enden eine untereinander homologe Region aufweisen. Unter Nutzung der erhaltenen DNA-Fragmente als Template für die zweite PCR-Reaktion konnte im darauffolgenden Schritt mit den jeweils äußeren Primern der ersten Reaktion ein Amplifikat erzeugt werden, welches in der Mitte eine zusätzliche Sequenz, z. B. Restriktionsschnittstelle, beinhaltete. Diese Form der PCR wurde mit Hilfe des Protokolls für die Phusion High Fidelity DNA Polymerase (2.7.6.2) für die Homologe Rekombination eingesetzt.

2.8.6.5 5'-RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die 5'-RACE-PCR ist eine Technik mit der das 5'-Ende einer mRNA ermittelt werden kann und somit der Startpunkt der Translation identifiziert werden kann. Für die Durchführung dieser Methode wurde das kommerziell erhältliche Kit „5'/3' RACE Kit, 2nd

Generation“ (Roche, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Ausgehend von isolierter Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum* (2.7.3) wurde diese mit Hilfe des Kits in cDNA umgeschrieben und mit genspezifischen Primern (Tab. 2.4) der Startpunkt ermittelt. Die Sequenzierung des erhaltenen PCR-Fragmentes erfolgte durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin).

2.8.7. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

2.8.7.1 Sondenherstellung

Die Erzeugung der Sonden erfolgte entsprechend den Herstellerangaben des „DIG-DNA Labeling Kits“ (Roche, Mannheim). Diese dienten im späteren Verlauf der Detektion von DNA- sowie RNA-Fragmenten beim Southern beziehungsweise Northern Blot. Dabei wurde die Sonde durch den Einbau von Desoxyuridin-Nukleotiden (dUTPs) mit kovalent gebundenem Digoxigenin markiert. Die Synthese des neuen DNA-Strangs wurde durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I unter Verwendung von hexameren „random“-Primern ermöglicht. Als Matrize für die Markierungsreaktion dienten geleluierte (2.7.3.5) PCR-Produkte mit einer Länge zwischen 200 und 1000 Bp. Die Menge an DNA im Markierungsansatz betrug 100–500 ng.

2.8.7.2 Southern Blot

Der Southern Blot ist ein Kapillarblotverfahren (Southern, 1975), bei dem ihrer Länge nach gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf einer Nylonmembran fixiert werden, um später durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde ganz spezifisch Gensequenzen nachweisen zu können. Dabei wird die denaturierte DNA aus einem Agarosegel durch vertikale Kapillarkräfte auf eine für Makromoleküle undurchlässige Membran transferiert. Die im Vorfeld mit Restriktionsenzymen (Tab. 2.6) behandelte DNA wurde in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 10 min in 0,25 N HCl gewaschen, um Einzelstrangbrüche zu erzeugen und so den Transfer der DNA zu erleichtern. Im Anschluss erfolgten eine Denaturierung und Neutralisierung für je 30 min bei RT, bevor das Agarosegel für 5 min mit 2x SSC gespült wurde. 4 Lagen Whatman-Papier (Schleicher&Schuell, Dassel) und die Nylonmembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und für den Aufbau des Blots mit 2x SSC befeuchtet. Auf einen Stapel Filterpapier von ca. 10 cm wurden zunächst das Whatman-Papier und darauf die Nylonmembran platziert, bevor das Agarosegel luftblasenfrei auf-

gelegt wurde. Der Blot wurde durch eine gereinigte Glasscheibe und ein Gewicht stabilisiert. Nach etwa 15 - 20 h wurde die Glasscheibe vorsichtig entfernt, um im Anschluss die DNA auf der Nylonmembran mittels *cross-linking* kovalent und irreversibel zu fixieren.

Denaturierungspuffer

NaOH	35,06	g
NaCl	16	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

Neutralisierungspuffer

NaCl	87,66	g
Tris	60,55	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

Der Puffer wurde vor dem Autoklavieren mit konzentrierter HCl auf pH 7,5 eingestellt.

20x SSC-Puffer

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

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

2.8.7.3 Southern Blot - Hybridisierung

Um die kovalent an die Membran gebundene DNA für die Detektion vorzubehandeln, erfolgte die Vorhybridisierung und die Hybridisierung mit der markierten Sonde in Hybridisierungsröhrchen der Firma Ochs (Bovenden) in einem Hybridisierungsöfen (Biometra, Göttingen) bei 42 °C. Dazu wurde die Nylonmembran vorsichtig mit einer Pinzette in das Hybridisierungsröhrchen geschoben und wie folgt behandelt:

1. Inkubation: 1 h mit Hybridisierungspuffer
2. Verwerfen des Hybridisierungspuffers
3. Zugabe der markierten Sonde zu 5 ml Hybridisierungspuffer
4. Denaturierung der Sonde durch 10 min Inkubation bei 100 °C
5. Zugabe der kochenden Sonde zur Membran
6. Hybridisierung über Nacht für mindestens 15 h
7. Abgießen der Sonde
8. Zweimaliges Waschen der Membran mit 2x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS, für 15 min RT

Die Membran konnte anschließend direkt zur Detektion eingesetzt werden.

Hybridisierungspuffer

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

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

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

2.8.7.4 Detektion Digoxigenin-markierter DNA (Southern Blot)

Die Detektion der Digoxigenin-markierten DNA erfolgte mittels eines Immunoassays durch NBT (nitro-blau-tetrazolium-chlorid) und BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat). Das zur Markierung der Sonde verwendete Digoxigenin dient dabei als Antigen für einen mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelten Antikörper (Roche, Mannheim). NBT und BCIP (AppliChem, Darmstadt) fungieren als Substrate der alkalischen Phosphatase, und werden zu einem sichtbaren, blauvioletten Farbkomplex umgesetzt. Die Entstehung dieses Farbkomplexes gilt als Nachweis für die DNA. Zur Detektion der DNA wurde die Membran bei RT wie folgt behandelt:

1. Waschen der Membran: 1 min mit Puffer 1
2. Inkubation: 1-2 h in Puffer 2
3. Waschen der Membran: 5 min mit Puffer 1
4. Inkubation: 30 min mit 20 ml Antikörper-Konjugat-Lösung
5. Zweimaliges Waschen der Membran: 15 min mit Puffer 1
6. Äquilibrierung der Membran: 2 min mit Puffer 3
7. Zugabe der Färbelösung und Inkubation im Dunkeln bis Banden sichtbar werden
8. Abbruch der Färbung durch Waschen der Membran mit *A. dest.*

Abschließend wurde die Nylonmembran fotografiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

Puffer 1

Tris-HCl	100	ml
NaCl	8,76	g
<i>A. dest.</i>	ad	1000 ml

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

Puffer 3

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

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

Puffer 2

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

Antikörper-Konjugat-Lösung

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

Färbelösung

Puffer 3	5	ml
NBT/BCIP-Lsg	40	µl

2.8.7.5 Northern Blot

Im Gegensatz zum Southern Blot wird beim Northern Blot isolierte RNA elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf die Nylonmembran übertragen. Dafür wird die Gesamt-RNA im denaturierenden Agarosegel (2.7.4.2) aufgetrennt und zur partiellen Hydrolyse für 5 min in 50 mM NaOH inkubiert und anschließend für 5 min in

0,1 M Tris-HCL (pH 7,4) neutralisiert. Die Strangbrüche durch die Hydrolyse erleichterten den Transfer der RNA auf die Membran.

Der Aufbau des Northern Blots war analog zu dem des Southern Blots (2.7.7.2). Anstelle des Befeuchtens des Whatman®-Blotting-Papiers und der Nylonmembran mit 10x SSC Puffer erfolgte dies mit 2x SSC-Puffer.

2.8.7.6 Northern Blot - Hybridisierung

Die an der Membran gebundene RNA wurde in Hybridisierungsröhrchen (Ochs, Bovenden) mit der Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert, wie bereits unter 2.7.7.3 erläutert. Nach etwa 20 h wurde die Hybridisierung durch zwei Waschschritte beendet:

1. 2 x 5 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS (w/v) bei Raumtemperatur
2. 2 x 15 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS (w/v), bei 68 °C

Prä-/Hybridisierungslösung

20x SSC-Puffer	12,5	ml
Na-P-Puffer (0,5 M, pH 7,2)	5	ml
Blocking-Reagenz	1	g
SDS	3,5	g
N-Laurylsarcosin	50	µl
Formamid (deionisiert)	25	ml
<i>A. dest.</i>	50	ml

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

20x SSC-Puffer	80	ml
SDS-Lösung (25 % [w/v])	3,2	ml
<i>A. dest.</i>	ad	800 ml

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

20x SSC-Puffer	4	ml
SDS-Lösung (25 % [w/v])	3,2	ml
<i>A. dest.</i>	ad	800 ml

2.8.7.7 Detektion Digoxigenin-markierter DNA (Northern Blot)

Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte wie beim Southern Blot (2.7.7.4) mit einem Konjugat aus Anti-Digoxigenin-Antikörper und einer alkalischen Phosphatase (Roche, Mannheim). Jedoch wurde beim Northern Blot anstatt des Substrats BCIP/NBT Cyclodioxetanphosphat (CDP-Star, Roche, Mannheim) eingesetzt. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung des Substrats, wodurch dieses zerfällt und Licht mit einer Wellenlänge von 466 nm abgibt. Die Detektion der Chemilumineszenzen erfolgte mittels einer entsprechend sensiblen Kamera.

Alle Arbeitsschritte fanden bei RT statt.

1. Inkubation der Membran: 1 min mit Waschpuffer
2. Inkubation: 30 min mit 40 ml Puffer 2 (Blockierung unspezif. Bindungsstellen)
3. Verwerfen des Puffer 2
4. Inkubation mit 20 ml Puffer 2 und 4 µl Anti-Digoxigenin-Antikörper-Konjugat
5. 2x Waschen mit Puffer 1 für 15 min (Entfernung ungebundener Antikörper)
6. Äquilibrierung der Membran für 2 min mit Puffer 3
7. Zugabe von 50 µl CDP-Star-Stammlösung zu 5 ml Puffer 3 und 5 min Inkubation der Membran
8. Die Membran wurde in Frischhaltefolie verpackt und die Signale mittels Luminescent Image Analyzer LAS-1000 (Fujifilm, Düsseldorf) bei 15 s bis 30 min Exposition detektiert.

Waschpuffer

Puffer 1 (pH 7,5)	100	ml
Tween 20	300	µl

Puffer 1 (pH 7,5)

Maleinsäure	11,6	g
NaCl	8,77	g
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren eingestellt: bis pH-Wert von 6,7 mit NaOH-Plätzchen, danach mit 10 M NaOH.

Puffer 2

Puffer 1 (pH 7,5)	100	ml
Blocking-Reagenz	1	g

Puffer 3 (pH 9,5)

Tris	12,1	g
NaCl	5,85	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,17	g
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

2.9. DNA-Transfer in Mikroorganismen

2.9.1 CaCl₂-vermittelte Transformation in *E. coli*

Bei der Transformation der Plasmide in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH5α-Zellen (Hannahan, 1983, mod.) wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut und dann davon 50 µl zu 20 µl Ligationsansatz gegeben. Daraufhin wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und dann für 60 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Nach der Rücküberführung des Transformationsansatzes auf Eis erfolgte die Zugabe von 300 µl LB-Medium. Zur Regeneration schloss sich eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 400 Upm (Thermomixer 5436; Eppendorf, Hamburg) an. Abschließend wurden 50 µl bis 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit den für die Selektion erforderlichen Zusätzen (Tab. 2.5) ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

2.9.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Methode der Elektroporation erfolgte prinzipiell nach Dower *et al.* (1988) unter Verwendung eines GenePulsersTMII (Bio-Rad Laboratories, München). Hierfür wurden die nachfolgend aufgeführten methodischen Schritte ausgeführt:

1. Verdünnung des Ligationsansatzes auf 1:10
2. Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) bei -20 °C vorkühlen, anschließend auf Eis überführen
3. Auftauen elektrokompetenter Zellen auf Eis
4. Zugabe von 38 µl kompetenten Zellen zu 2 µl Ligationsansatz
5. Elektroporation: 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV (→ Zeitkonstante 4,5 – 5,2 ms)
6. Zugabe von 1 ml LB-Medium (vorgewärmt)
7. Inkubation: 60 min, 37 °C
8. Ausplattieren von Aliquots des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten
9. Inkubation ü. N. bei 37 °C

2.9.3 Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation

Die Transformation von *C. acetobutylicum* wurde im Wesentlichen nach Mermelstein *et al.* (1992) mittels eines GenePulsersTMII (Bio-Rad Laboratories, München) durchgeführt. Die Elektroporation erfolgte unter Sauerstoffausschluss in einer Anaerobenkammer (MACS-MG 1000, Meintrup dws, Lähden-Holte) unter Verwendung von stets frisch hergestellten kompetenten Zellen von *C. acetobutylicum*. Dafür wurden 50 ml CGM aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 37 °C inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und sind nachfolgend dargestellt:

1. Inkubation der Hauptkultur 30 min auf Eis
2. Zentrifugation: 5 min, 5000 x g, 4 °C
3. Waschen der Zellen mit 10 ml E-Puffer (vorgekühlt bei 4 °C)
4. Zentrifugation: 5 min, 5000 x g, 4 °C
5. Resuspendieren des Zellpellets in 2 ml E-Puffer
6. Überführen von Plasmid (25 µl) und kompetenten Zellen (350 µl) in Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand, vorgekühlt bei -20 °C)
7. Inkubation 5 min auf Eis
8. Elektroporation: 50 µF, 600 Ω, 1,8 kV (→ Zeitkonstante 15-25 ms)
9. Zugabe von 800 µl CGM
10. Überführen der Suspension in Schraubdeckelröhrchen
11. Inkubation 4 h bei 37 °C
12. Ausplattieren auf RCA-Selektionsplatten
13. Inkubation anaerob bei 37 °C für mindestens 48 h

Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4)

NaH ₂ PO ₄ (200 mM)	22,6	ml
Na ₂ HPO ₄ (200 mM)	77,4	ml

Elektroporationspuffer

Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4)	150	µl
Saccharose (270 mM)	10	ml

2.10 Konstruktion von Defektmutanten

2.10.1 ClosTron®-Insertionsmutagenese (Heap *et al.*, 2007)

Das ClosTron® System ermöglicht eine gezielte Genaktivierung durch Insertionsmutagenese. Dabei werden zunächst durch einen Algorithmus (<http://clostron.com/clostron2.php>) mögliche Insertionsorte ermittelt und an das jeweilige Zielgen angepasste Primer abgeleitet, um ein mobiles Gruppe-II-Intron mit der SOE-PCR (2.8.6.3) gezielt zu modifizieren. Nach Klonierung in den Vektor pMTL007C-E2 und *in vivo* Methylierung des Konstruktes durch Transformation in *E. coli* pANII (2.9.2) kann die Transformation in *C. acetobutylicum* erfolgen (2.9.3). Der Nachweis einer erfolgreichen Transformation erfolgt durch Wachstum aus RCA-Platten (2.3.2) mit Thiamphenicol (Tab. 2.5). Einzelne Kolonien können nun durch eine zweite Selektion auf RCA-Platten mit Erythromycin untersucht werden. Bei erfolgter Integration des Introns in das Genom von *C. acetobutylicum* wird eine Erytro-mycin-Resistenz vermittelt. Ob die Insertion auch tatsächlich und ausschließlich im Zielgen stattgefunden hat, kann durch ein PCR-Screening (2.8.6.2) von einzelnen Kolonien, sowie durch Southern Hybridisierungen (2.8.7.2) mit einer Gen- und einer ErmRAM-spezifischen Sonde nachgewiesen werden.

2.10.2 Homologe Rekombination (Soucaille *et al.*, 2006)

Eine weitere Methode der Konstruktion von Defektmutanten stellt die Homologe Rekombination dar. Zunächst erfolgt die Amplifikation der stromaupwärts (linker) und stromabwärts (rechter) Bereiche (Homologie Arm) um die Zielsequenz herum durch die Fusions-PCR (2.8.6.4). Das Fragment wird dann in einen Shuttle-Vektor, z. B. pJet 1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) kloniert und anschließend restriktiert mit *Eco*147I zur Insertion eines Selektionsmarkers (mlsR-Kassette) zwischen die flankierenden Homologie-Armen. Das erhaltene Konstrukt wird dann in den Vektor pCons::*upp* kloniert und anschließend methyliert, um in *C. acetobutylicum* (2.9.3) transformiert zu werden. Zur Selektion von *C. acetobutylicum*-Klonen bei denen ein positives homologes Rekombinationseignis stattgefunden hatte, erfolgte in einem doppelten Selektionsverfahren. Zunächst wurde ein Klon ü. N. in 10-ml-CGM_{Ery} kultiviert. Anschließend folgte sechs Tage lang das Überimpfen von 0,1 Vol der 10 ml-MS-MES-Kultur des jeweils vorangegangenen Tages ohne Antibiotikumzusatz. Ab dem 2. Tag ohne Antibiotikumzusatz wurde eine Verdünnungsreihe der Kultur hergestellt, die in

der Anaerobenbox auf RCA_{Ery} und RCA_{Thiam} ausplattiert wurden. Bei erfolgreich stattgefundenem Rekombinationseignis und zusätzlichem Verlust des Rekombinationsplasmides sollten sukzessive weniger Kolonien auf RCA_{Thiam} zu finden sein, als auf RCA_{Ery}. Sobald das Verhältnis von Thiam-resistanten Klonen zu Ery-resistanten Klonen deutlich geringer war, erfolgte ein erneutes Screening von Ery-resistanten Klonen erneut auf RCA_{Ery} und RCA_{Thiam}. Klone die gegen Erythromycin resistant und gleichzeitig sensitiv gegenüber Thiamphenicol waren, waren putativ positiv. Zur Bestätigung des korrekten Austausches von Zielsequenz mit der MlsR-Kassette und gleichzeitigem Plasmid-Verlust wurden PCR-Analysen (2.8.6.2) und ein Southern Blot (2.8.7.2) nach DNA-Isolation (2.7.2) durchgeführt.

2.11 Arbeiten mit Proteinen

2.11.1 Isolierung von Gesamtprotein mittels Ultraschall

Für die Gewinnung von Proteinproben aus *E.coli* wurden zunächst 250-ml-Kulturen durch Zentrifugation (10000 x g, 4 °C, 10 min) pelletiert und in 5 ml Puffer W (2.11.3) aufgenommen und bis zur Lyse bei -20 °C gelagert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte unter Eiskühlung mittels Ultraschall (UP200S Hielscher, Teltow) unter Nutzung einer Sonotrode der Stärke S2, einer Amplitude von 80 % und einem Cycle von 0,8 und für eine Dauer von 10 min (alternierend 1 min Ultraschall und 1 min Pause). Im Anschluss konnte das geklärte Lysat durch Zentrifugieren bei 16000 x g, 4 °C und 30 min gewonnen werden und für die Affinitätschromatographie (2.11.3) eingesetzt werden. Das Gesamt-Protein von *C. acetobutylicum* wurde aus entsprechenden 50-ml-Kulturen isoliert. Nach Sedimentation der Zellen (10000 x g, 4 °C, 10 min) und einmaligem Waschen der Zellen in TE-Puffer erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschall in 2-ml-Reaktionsgefäßen unter Kühlung für 30-60 min (alternierend 3 min Ultraschall und 1 min Pause) mit einer S1 Sonotrode (50 % Amplitude, Cycle 0,5). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugieren (16.000 x g, 4 °C, 30 min) pelletiert und der Proteingehalt des klaren Überstandes konnte bestimmt werden (2.10.2).

2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen wurde die Methode nach Bradford (1976) angewandt. Dafür wurden 50 µl (ggf. verdünnt) des nach dem Zellauf-

schluss gewonnenen klaren Überstandes mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Blindwert mit 50 µl *A. dest.* und 1 ml Bradford-Reagenz im Photometer (UltronSpec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg) in Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Mit Hilfe einer mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichgerade im Bereich von 0-0,15 mg/ml konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben errechnet werden.

Bradford-Reagenz

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

Das Reagenz wurde lichtgeschützt bei RT gelagert.

2.11.3 Affinitätschromatographie mit *Strep-Tactin-Sepharose*

Zur Isolierung von *Strep-tagII*-Fusions-Proteinen aus dem durch Ultraschall gewonnenen (2.11.2) Rohextrakt von *E. coli*-Kulturen erfolgte die Affinitätschromatographie an *Strep-Tactin-Sepharose* (IBA, Göttingen) wie bei Riebe (2009) beschrieben. Die aufgereinigten *Step-tagII*-Fusionsproteine wurden bei -20°C gelagert. Die Verifikation der erfolgreichen Aufreinigung wurde zum einen durch Konzentrationsbestimmung nach Bradford (2.11.2) als auch durch die SDS-PAGE (2.11.4.1) durchgeführt.

2.11.4 Polyacrylamidgelektrophorese

2.11.4.1 Eindimensionale SDS-PAGE (1D-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht diente die denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese (Laemmli, 1970; mod.). Standardmäßig erfolgte die Trennung der Proteine in einem 12 %igen Polyacrylamidgel. Die Zusammensetzung, der Aufbau sowie die Durchführung sind bei Lehmann (2009) beschrieben.

2.11.4.2 Kolloidale Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1988)

Zur Färbung der SDS-Polyacrylamidgele (2.11.4.1) wurde kolloidales Coomassie verwendet. Zunächst wurden die Gele für 1 h in Fixierer geschwenkt und anschließend

erfolgte die Inkubation in der Färbelösung für max. 24 h. Die Gele wurden mit *A. dest.* entfärbt und photographiert.

Fixierer		Kolloidales Coomassie	
Essigsäure	100 ml	Coomassie Brillant Blue G250	0,75 g
Ethanol (96 %, reinst)	500 ml	o-Phosphorsäure (85 %)	15 ml
<i>A. dest.</i>	ad	Ammoniumsulfat	75 g
	1000 ml	Methanol	250 ml
		<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

2.11.5 Western Blot

Für den Nachweis spezifischer Proteine mit Hilfe des Western Blots musste zunächst ein Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (2.11.4.1) auf eine Nitrocellulosemembran erfolgen. Dazu wurde eine Blotkammer der Firma Biometra verwendet. Der Ablauf des Transfers sowie die Detektion spezifischer Proteine durch Antikörperbindung kann bei Lehmann (2009) nachvollzogen werden.

2.11.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay, oder auch Gelretardierung genannt, stellt eine Methode zur Untersuchung von Protein-Nukleinsäure-Komplexen dar und kann somit darüber Aufschluss geben, ob ein Protein *in vitro* mit einer bestimmten DNA-Sequenz (Promotorbereich) interagieren kann. Die Bildung von Protein-DNA-Komplexen führt zu einem veränderten Laufverhalten im nativen Polyacrylamid- oder Agarosegel, welches detektiert werden kann. Dafür wurde der ausgewählte DNA-Bereich zunächst mit einer PCR amplifiziert (2.8.6.2), aufgereinigt (2.8.3.2) und dessen Konzentration bestimmt (2.8.5). Wenn vermerkt, wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente mit Hilfe des „DIG Gel Shift Kit 2nd Generation“ (Roche, Mannheim) mit Digoxigenin markiert. Die für den EMSA eingesetzten Strep-tagII-Fusions-Proteine (2.11.3) wurden zuvor isoliert, aufgereinigt und deren Konzentration bestimmt (2.11.2). Die Bindungsreaktionen erfolgten in Abhängigkeit vom jeweiligen Protein in verschiedenen Puffersystemen.

Bindepuffer 1 (Toyoda *et al.*, 2008)

Tris-HCl (pH 8,0)	10	mM
NaCl	250	mM
EDTA	1	mM
DTT	1	mM
Glycerin [v/v]	10	%
BSA	7,5	µg/µl

Bindepuffer 2 (Antunes *et al.*, 2012)

Tris-HCl (pH 7,5)	10	mM
KCl	50	mM
EDTA	1	mM
DTT	1	mM
Glycerin [v/v]	10	%
BSA	50	µg/µl
Nonidet P-40	0,05	%

Das finale Volumen der Reaktionsansätze betrug 20 µl. Die eingesetzte Menge an DNA variierte in Abhängigkeit der Detektion des jeweiligen EMSAs. Wenn es sich dabei um Digoxigenin-markierte DNA handelte, so wurden pro Ansatz 0,4 ng eingesetzt. Bei Ethidiumbromid-gefärbten EMSAs wurde stattdessen 5 ng an DNA pro Reaktionsansatz verwendet. Die Proteinkonzentration der Ansätze variierte zwischen 0 und 0,4 µg. Die Ansätze wurden für 20 min bei 25 °C inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Loading Buffer abgestoppt. Für Kompetitor-Experimente bzw. zur Testung des Einflusses verschiedener putativer Effektoren auf die Protein-DNA-Interaktion wurde das Protein zunächst in dem Bindepuffer mit eben genannten für 20-30 min inkubiert, bevor die DNA hinzugefügt wurde. Als unspezifischer Kompetitor diente poly [d(I-C)] (10 µg/ml). Als Protein-Negativkontrolle wurde BSA dem Bindepuffer zugesetzt, um unspezifische Proteinbindungen ausschließen zu können. Die Auftrennung erfolgte im 1,5 %igen Agarosegel oder im 6 %igen nativen Polyacrylamidgel. Die Polyacrylamidgele wurden als Fertiggele von der Firma biostep GmbH (Jahnsdorf) erworben. Zur Vermeidung einer Überhitzung der Gele während des Laufs, wurde die Elektrophorese bei 4 °C in 0,5 x TBE-Puffer bei einer elektrischen Spannung von 60 V für Agarosegele bzw. 80 V für Polyacrylamidgele durchgeführt. Nach Angaben des Herstellers erfolgte vor der Beladung ein Vorlauf der Polyacrylamidgele für 1 h bei 100 V.

10 x TBE-Puffer (Sambrook und Russel, 2001)

Tris (0,89 M)	108	g
Borsäure (0,89 M)	55,3	g
EDTA (0,5 M; pH 8)	40	ml

Nach der Auftrennung der Digoxigenin-markierten DNA in den Agarosegelen wurden diese wie dem Southern Blot auf eine Nylonmembran transferiert (2.8.7.2) und anschließend wie bei dem Northern Blot detektiert (2.8.7.7).

2.11.7 Bestimmung der Phosphofruktokinase (PFK) Aktivität

Zur Bestimmung der Phosphofruktokinase Aktivitäten (1-PFK und 6-PFK) wurden die verschiedenen *C. acetobutylicum*-Stämme zunächst in MS-MES mit Glukose, Fruktose oder mit einem Glukose-Fruktose-Gemisch (2.3.2) kultiviert. Pro Messung wurden 50 ml exponentiell gewachsener Zellen sedimentiert (10 000 x g, 4 °C, 10 min), zweimal mit 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) gewaschen und bei -20 °C bis zur Aktivitätsmessung gelagert. Die Zellpellets wurden in 1 ml Ultraschallpuffer (50 mM Tris-HCl and 20 mM 2-

Mercaptoethanol, pH 8.0) resuspendiert, bevor der Aufschluss (2.11.1) und die Konzentrationsbestimmung (2.11.2) erfolgte. Die Assays zur Bestimmung der l-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofructokinase wurden unter aeroben Bedingungen nach Hugo und Gottschalk (1974) durchgeführt. Folgende Komponenten wurden dazu in einem finalen Volumen von 1 ml für 10 min bei 30 °C inkubiert:

Tris-HCl (pH 8,0)	50	mM
MgCl ₂	5	mM
ATP	2	mM
F-1-P / F-6-P	5	mM
PEP	5	mM
Pyruvat Kinase	20	µg
Gesamt-Protein	1	mg

Im Anschluss wurde die Reaktion im Heizblock durch 2 minütige Inkubation bei 100 °C abgestoppt und die Proben für 5 min zentrifugiert (15 000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert. Kontrollen wurden ohne Zugabe von F-1-P bzw. F-6-P durchgeführt. Die Menge an gebildetem Pyruvat in 50 µl des jeweiligen Überstandes konnte mit Hilfe eines Pyruvat-Kits (K-PYRUV, Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland) gemäß den Angaben des Herstellers gemessen werden. Anhand der ermittelten Menge an Pyruvat wurden die spezifischen Aktivitäten der Phosphofruktokinasen nach folgender Formel berechnet. Eine Enzymeinheit katalysiert den Umsatz von 1 µmol Substrat pro min unter den definierten Bedingungen.

$$[10] \quad \text{Spez. Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot c} \cdot VF \left[\frac{U}{mg} \right]$$

Formel 10: Spezifische Aktivität. V, Volumen des Ansatzes; v, Volumen der Probe; ΔE, Extinktionsänderung; ε, Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm (6300 1 M⁻¹ cm⁻¹); d, Schichtdicke der Küvette (1cm); c, Proteinkonzentration

2.12. Bezugsquellen

Chemikalien ohne besonderen Vermerk wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth & Co. (Karlsruhe), Diagonal (Münster), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt) bezogen. In der Regel hatten sie die Reinheitsgrade ‚reinst‘ oder ‚zur Analyse‘. Gase wurden von der Westfalen AG (Münster) geliefert.

Tab. 2.7: Bezugsquellen für Chemikalien

Firma	Produkte
AppliChem, Darmstadt www.applichem.com	EDTA, Formaldhyd, Formamid, RNaseA, Lysozym, Erythromycin, NTA, TEMED, Phenol pH 4, Proteinase K, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Ethidiumbromid, Fruktose, Glukose, Mannose, Mannitol, BSA, RNase-ExitusPlus™, ATP, NADP, Agarose
Biometra GmbH, Göttingen www.biometra.com	PCR-Cycler, PowerPack P25, Blotkammer, Eco-Mini
BIORAD GmbH, München www.bio-rad.de	Gene Pulser™II
Biostep GmbH, Jahnsdorf www.biostep.de	Fertig-Polyacrylamidgele (6 % TBE-Gel, 10 Bahnen)
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe www.carl-roth.de	DMF, Brilliant Blue G-250
Difco Laboratories, Hamburg http://www.bd.com/ds/	Agar-Agar, Hefeextrakt, Trypton
IBA GmbH, Göttingen www.ibo-go.com	Strep-Tactin-Sepharose, Desthiobiotin, <i>Strep</i> -Tactin-AP-Konjugat
Megazyme International Ltd., Wicklow, Irland, www.megazyme.com	D-Fructose/D-Glucose Kit, D-Mannose/D-Fructose/D-Glucose Kit, Pyruvic Acid
Merck, Darmstadt www.merck.de	Chloramphenicol
OXOID, Wesel www.oxoid.com	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
PeqLab, Erlangen www.peqlab.de	peqGOLD Pwo-DNA-Polymerase
Qiagen, Hilden www.qiagen.com	QIAquick Gel Extraktion Kit
Roche, Mannheim www.roche.com/de	Blocking Reagenz, DIG DNA Labeling Kit, DIG labeled DNA-/RNA-Molecular Weight Marker, DIG Gel Shift Kit 2nd Generation, 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation, CDP-Star, NBT/BCIP, Hexokinase / Glukose-6-Phosphat-DH, DNaseI
Sigma-Aldrich, Taufkirchen www.sigmaldrich.com/	Ampicillin, Thiamphenicol, Oligonukleotide, Fruktose-1-Phosphat; Fruktose-6-Phosphat; PEP; Pyruvat-Kinase
Thermo Scientific, Schwerte http://www.thermoscientificbio.com/	Restriktionsenzyme, Protein Molecular Weight Marker (SM0431, SM0441), GeneRuler 1kb DNA Ladder (SM0311), MassRuler (SM403), dNTP's, SAP, T4-DNA-Ligase, CloneJET PCR Cloning Kit

3. Ergebnisse

3.1 Organisation der Fruktose-Phosphotransferase Systeme

Die Grundlage für die Untersuchungen des Fruktose-Metabolismus stellte sowohl die Identifizierung (Nölling *et al.*, 2001) als auch die Klassifizierung (Mitchell und Tangney, 2005) der substratspezifischen Phosphotransferase Systeme (PTS) von *C. acetobutylicum* dar. Durch Transkriptionsanalysen konnten drei von insgesamt 13 PTS mit der Aufnahme von Fruktose in Verbindung gebracht werden (Servinsky *et al.*, 2010). Das dafür vermutlich hauptsächlich verantwortliche PTS, PTS^{Fru}, gehört der Fruktose/Mannitol-Familie (Fru-Familie) an und wird von dem polycistronischen Operon *cac0231-cac0234* codiert, welches im Folgenden als *fru*-Operon bezeichnet wird. Neben den beiden Genen *cac0233* (*fruC*, EIIA) und *cac0234* (*fruD*, EIIBC), welche die drei Domänen des Enzym II codieren, zählen auch die Gene *cac0231* (*fruR*, „DeoR-type transcriptional regulator“) und *cac0232* (*fruB*, 1-Phosphofruktokinase) dazu (Abb. 3.1a).

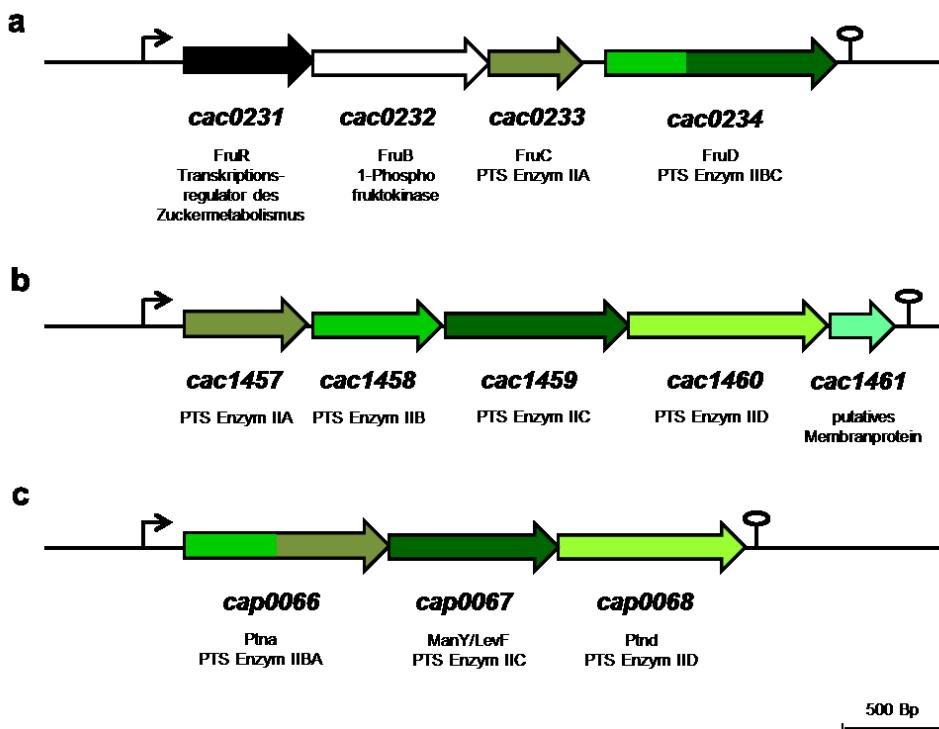


Abb. 3.1: Genetische Organisation der Fruktose Phosphotransferase Systeme von *C. acetobutylicum*. Dargestellt sind die drei Operone (a, *fru*; b, *manI*; c, *manII*), die mutmaßlich für die Aufnahme von Fruktose verantwortlich sind (Details siehe Text). Jedes Gen wird dabei durch einen Pfeil repräsentiert, dessen Orientierung die des jeweiligen Gens, sowie dessen relative Größe angibt. Putativ gleiche Enzym II- Domänen entsprechen derselben Farbe.

Die anderen beiden PTS, PTS^{ManI} und PTS^{ManII}, zeigen hohe Sequenzhomologien zur Mannose/Fruktose-Familie (Man-Familie) (Mitchell und Tangney, 2005). Charakteristisch für diese EII-Proteinkomplexe ist, dass sie aus vier Untereinheiten (EIIA, EIIB, EIIC, EIID) aufgebaut sind (Postma *et al.*, 1993). Das Operon *cac1457-cac1461*, im Weiteren als *manI* bezeichnet, besteht aus fünf aufeinander folgenden Genen (Abb. 3.1b). Die Gene *cac1457-cac1460* codieren jeweils für eine Untereinheit des Enzym II (EII). Des Weiteren enthält das *manI*-Operon das Gen *cac1461*, welches für ein putatives Membranprotein codiert. Das Operon *cap0066-cap0068 (manII)* codiert für das dritte mutmaßlich an der Fruktose-Aufnahme beteiligte PTS und ist auf dem Megaplasmid pSOL1 von *C. acetobutylicum* lokalisiert. Dieses tricistronische Operon besteht aus den Genen *ptna* (*cap0066*, EIIAB), *manY/levF* (*cap0067*, EIIC) und *ptnd* (*cap0068*, EIID) (Abb. 3.1c).

3.2 Konstruktion von PTS-defizienten Stämmen

3.2.1 Homologe Rekombination in *C. acetobutylicum*

Zur Beantwortung der Frage, ob die unter 3.1 dargestellten Phosphotransferase Systeme an der Fruktose-Aufnahme und Umsetzung maßgeblich beteiligt sind, sollten die einzelnen Operone durch eine zielgerichtete Deletion bzw. Insertion inaktiviert werden. Durch Homologe Rekombination (2.10.2) konnten sowohl das *fru*- als auch das *manII*-Operon aus dem Genom von *C. acetobutylicum* entfernt und gegen eine Erythromycin-Resistenzkassette (*mls*) ausgetauscht werden. Dafür wurden zunächst die jeweiligen Rekombinationsplasmide pCons::*fru* und pCons::*manII* hergestellt. Diese basieren auf dem Vektor pCons::*upp* (Abb. A.1; Soucaille *et al.*, 2006), der zum einen eine Chloramphenicol-Resistenz besitzt, als auch einen Replikationsursprung (*repL*) für Gram-positive Bakterien. Für den korrekten Austausch in der gewünschten Zielregion erfolgte die Herstellung der sogenannten Homologen Arme (HA), durch die die Erkennung des gewünschten Bereiches ermöglicht wurde (Abb. 3.2a). Sowohl stromaufwärts („linker Homologer Arm, LHA“) als auch stromabwärts („rechter Homologer Arm, RHA“) des jeweiligen Operons wurden ca. 1 kBp-große genomische Bereiche mittels PCR amplifiziert (Abb. 3.2b). Beide erzeugten Fragmente konnten über die Fusions-PCR (2.8.6.4) zu einem Fragment vereinigt werden, welches in der Mitte die eingefügte *StuI*-Restriktionserkennungssequenz besitzt (Abb. 3.2c). An den flankierenden Enden des Amplifikates befanden sich zusätzlich angefügte *BamHI*-Schnittstellen für die spätere

Klonierung in den Vektor pCons::*upp*. Nach erfolgter Klonierung des erhaltenen Fragmentes in den Shuttle-Vektor pJet 1.2 (Thermo Scientific) und Transformation in *E. coli* DH5α (2.9.1) konnten positive Klone durch Selektion mit Ampicillin erhalten werden. Die Verifikation der positiven Klone erfolgte durch Kontrollrestriktionen re-isolierter Plasmide (2.7.1) mit *Stu*I, welches eine Linearisierung der Plasmide bewirkte. Im nachfolgenden Schritt wurde die Erythromycin-Resistenzkassette *mls* über *Stu*I-kompatible Enden in den linearisierten Vektor ligiert. Die Selektion auf positive Transformanden wurde mit Ampicillin und Erythromycin durchgeführt. Durch Restriktion mit dem Enzym *Bam*HI konnte ein fertiges Konstrukt (LHA-*mls*-RHA) in den Zielvektor pCons::*upp* kloniert werden.

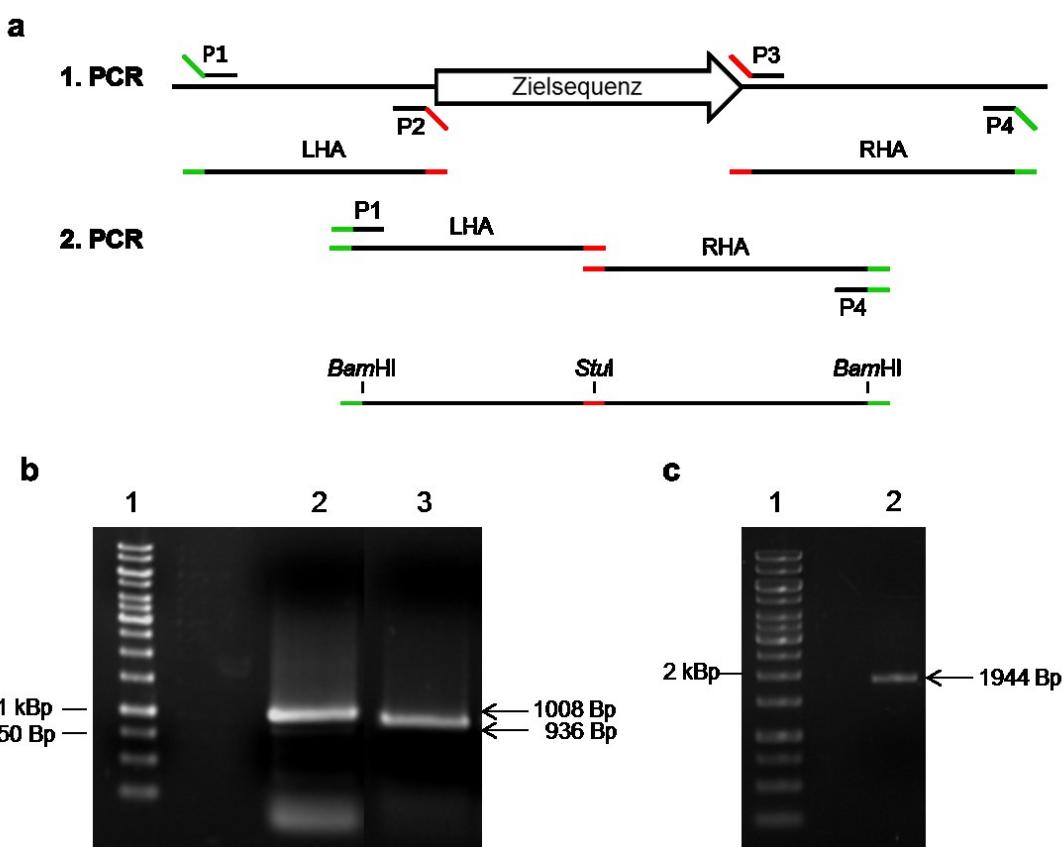


Abb. 3.2: Fusions-PCR zur Herstellung des Homologen Bereiches für die Homologe Rekombination. Schematische Darstellung der Fusions-PCR in zwei PCR-Reaktionen (a) und die relative Lage der Primer (P1-P4); (b) Amplifikation des linken homologen Armes (LHA, Spur 2) und des rechten homologen Armes (RHA, Spur 3) am Beispiel des *fru*-Operons, Längenstandard (1 kb ladder) in Spur 1; (c) Fusions-PCR (LHA+RHA) in Spur 2, Längenstandard (1 kb ladder) in Spur 1.

Durch Selektion mit Chloramphenicol und Erythromycin konnten positive Klone erhalten werden. Eine eindeutige Bestätigung der Korrektheit der erzeugten Plasmide erfolg-

te sowohl durch erneute Restriktionsanalysen sowohl mit *BamHI* als auch *StuI* (Abb. 3.3), sowie durch eine anschließende Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin).

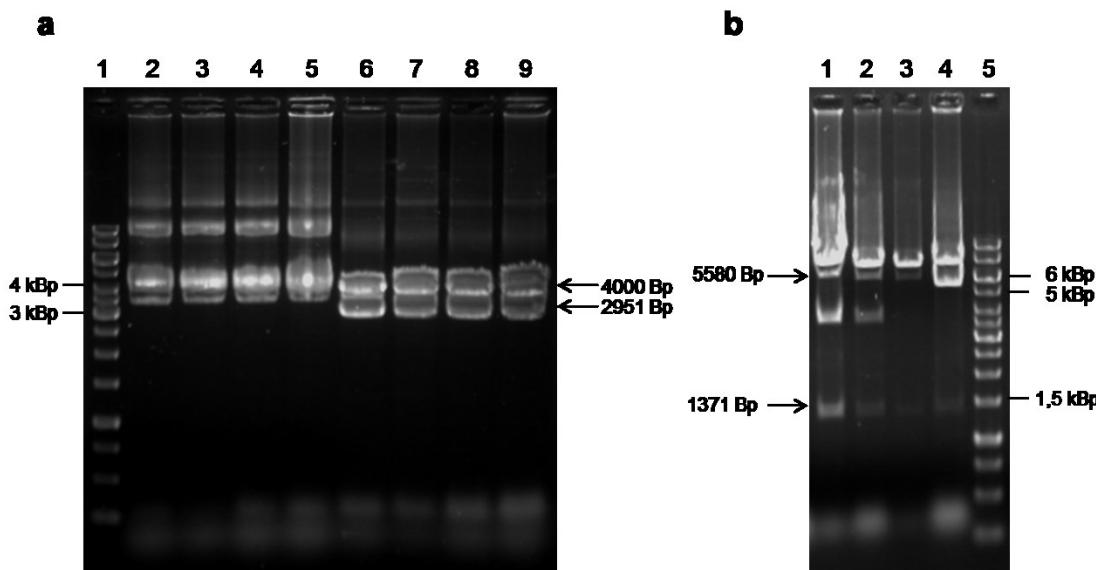


Abb. 3.3: Plasmidisolation und Restriktionsanalyse positiver Rekombinationsplasmide pCons::fru
Die Auf trennung erfolgte in einem 0,8 %igen Agarosegel: (a) Spur 1: Längenstandard (1 kb ladder), Spur 2-5: Plasmidisolation pCons::fru, Spur 6-9: Restriktion von pCons::fru mit *BamHI*; (b) Spur 1-4: Restriktion von pCons::fru mit *StuI*, Spur 5: Längenstandard (1 kb ladder).

3.2.2 ClosTron®-Insertionsmutagenese in *C. acetobutylicum*

Eine weitere Methode der gezielten Genaktivierung stellt das ClosTron®-System (Heap *et al.*, 2007; 2010) dar, welches mittlerweile sehr gut etabliert ist zur Erzeugung von Defektmutanten. Für die Generierung der Mutanten (2.10.1) bedarf es zunächst einer PCR-basierten Anpassung des Introns (2.8.6.3) an die Zielsequenz (*cac1457*), in die das mobile Gruppe II-Intron (350 bp) inserieren soll. Anschließend wurden das erhaltenen Fragment, sowie der Vektor pMTL007C-E2 (Abb. A.2) mit den Enzymen *HindIII* und *Bsp1407I* restriktiert, um für eine Ligation zueinander kompatible Enden zu erzeugen. Nach der Transformation in CaCl_2 -kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (2.9.1) konnten sowohl die Antibiotikum-Selektion (Cm) als auch ein Blau-Weiß-Screening angewandt werden, um positive Klone zu identifizieren. Das Prinzip dieses Screenings basiert in diesem Fall auf dem Verlust des *lacZ'*-Gens durch Restriktion des pMTL007C-E2-Vektors mit *HindIII* und *Bsp1407I*. Rekombinannten, deren *lacZ'*-Gen durch den Einbau des genspezifischen Fragments nicht mehr funktional ist, bilden demnach weiße Kolonien, aus denen die Plasmide isoliert und einer Kontrollrestriktion (Abb. 3.4), sowie einer Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) unterzogen wurden.

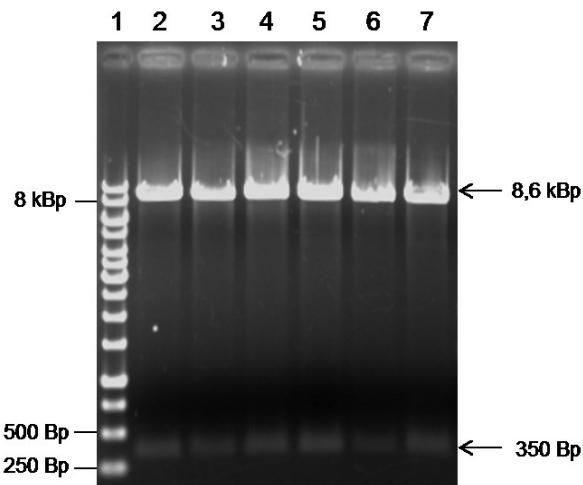


Abb. 3.4: Repräsentative Restriktionsanalyse rekombinanter pMTL007C-E2-Klone (*cac1457*) mit *HindIII* und *Bsp1407I*. Spur 1: Längenstandard (1 kb ladder) und Spur 2-7: restriktierte pMTL007C-E2 Plasmide (8,6 kbp) mit angepasstem Intron (350 bp). Die Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen [w/v] Agarosegel.

3.2.3 Transformation, Selektion und Verifikation der *C. acetobutylicum*-Mutanten

Bevor eine Transformation der hergestellten rekombinanten Plasmide erfolgen konnte, mussten diese einer *in vivo* Methylierung unterzogen werden. Dadurch wurde verhindert, dass die Plasmide durch die *C. acetobutylicum*-spezifische Restriktionsendonuklease *Cac824I* abgebaut werden. Dafür wurden die generierten Plasmide in den Stamm *E. coli* pANII elektroporiert (2.9.2). Dieser Stamm exprimiert eine Methyltransferase aus dem *Bacillus subtilis* Phagen Φ 3T, welche dieselbe Spezifität wie die DNA-Methylase aus *C. acetobutylicum* besitzt (Mermelstein und Papoutsakis, 1993). Mit Hilfe einer Restriktion der methylierten und isolierten Plasmide mit dem Enzym *SatI*, einem Isoschizomer von *Cac824I*, ließ sich der Erfolg der *in vivo* Methylierung bestätigen. Im Anschluss daran konnte die Transformation der Plasmide pCons::*fru*, pCons::*manII* und pMTL007C-*cac1457* in *C. acetobutylicum* (2.9.3) durchgeführt werden. Alle Transformationen lieferten Erythromycin-resistente Klone.

Die Selektion auf positive Mutanten bei denen das homologe Rekombinationsergebnis stattgefunden hatte, also der Austausch des jeweiligen Operons (*fru* oder *manII*) gegen die *mls*-Kassette und der Verlust bzw. Abbau des Plasmids, wurde in Anlehnung an Harris *et al.* (2002) durchgeführt (2.10.2). Im ersten Verfahren wurde jeweils eine einzelne Kolonie in Flüssigkultur mit Erythromycin angeimpft. Im weiteren Verlauf von fünf Tagen wurden täglich exponentiell gewachsene Zellen in frisches Medium ohne Antibiotikum überführt. Dadurch sollten Rekombinationsergebnisse begünstigt werden. Ab dem zweiten Tag ohne Antibiotikum-Zusatz wurden Kulturproben in Verdünnungs-

reihen (10^{-2} bis 10^{-4}) auf RCA_{Ery} und $\text{RCA}_{\text{Thiam}}$ ausplattiert. Die Anzahl der Kolonien wurde gezählt und das Verhältnis von Erythromycin-resistenten zu Thiamphenicol-resistenten Kolonien bestimmt. Durch den zügigen Abbau des Plasmids sollte das Verhältnis von Kolonien auf RCA_{Ery} und $\text{RCA}_{\text{Thiam}}$ ansteigen. Wenn signifikant weniger Kolonien auf Agarplatten mit Thiamphenicol ermittelt werden konnten, schloss sich der zweite Selektionsschritt an. Gewachsene Kolonien auf RCA_{Ery} wurden nun hinsichtlich ihres Unvermögens auf $\text{RCA}_{\text{Thiam}}$ zu wachsen überprüft. Nur solche Kolonien, die nur noch auf RCA_{Ery} und nicht mehr auf $\text{RCA}_{\text{Thiam}}$ wuchsen, wurden für eine abschließende Verifikation mittels PCR (2.8.6.2) und Southern Blot (2.8.7.2) herangezogen.

Auch für den Nachweis von positiven Insertionsmutanten mittels ClosTron[®]-System dienten sowohl ein PCR-Screening als auch der Southern Blot. Die Abbildung 3.5 fasst die Ergebnisse für alle drei generierten Defektmutanten zusammen. Für die Verifikation wurde zunächst genomische DNA der Mutanten und des Wildtyps isoliert (2.7.2). Mit Hilfe von Operon-flankierenden Primern (Tab. 2.4) konnte jeweils ein spezifisches Amplifikat für den Wildtyp erhalten werden. Die Deletionsmutanten Δfru und $\Delta manII$ zeigten ein verkleinertes Fragment im Gegensatz zum Wildtyp, da das jeweilige Operon (*fru*, 3600 Bp bzw. *manII*, 2749 Bp) durch die *mls*-Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Die Inserierung des Gruppe II Introns inklusive Erythromycin-Resistenzkassette in das *manI*-Operon (*manI::int*) bewirkte hingegen eine Vergrößerung des Operons von 2648 Bp auf 4448 Bp. Zur Durchführung der Southern Hybridisierung erfolgte zunächst eine vollständige Hydrolyse der DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese nicht in dem jeweiligen Operon (*fru*, *manII*) bzw. Gen (*cac1457*) sowie in den Resistenzkassetten (ErmRAM, *mls*) schneiden, sodass jeweils nur ein positives Hybridisierungssignal zu erwarten war. Etwa 500 ng genomische DNA wurden für den Southern Blot entweder mit *Cla*I (Nachweis Δfru), mit *Hha*I und *Nco*I (Nachweis *manI::int*) bzw. *Bcu*I (Nachweis $\Delta manII$) restriktiert. Zur Detektion der Fragmente für die Deletionsstämme (Abb. 3.5 d/f) dienten jeweils Operon-spezifische Sonden (*cac0234* bzw. *cap0067*). In beiden Southern Hybridisierungen war nur ein Fragment für die Wildtyp-DNA nachweisbar, sodass ein Verlust des jeweiligen Operons bestätigt werden konnte. Der abschließende Nachweis der Generierung der Insertionsmutante erfolgte mit Hilfe einer ErmRAM-spezifischen Sonde. Dabei zeigte sich nur für die Mutante *manI::int* ein Signal mit der entsprechenden Größe, da der Wildtyp keine Resistenzkassette besitzt.

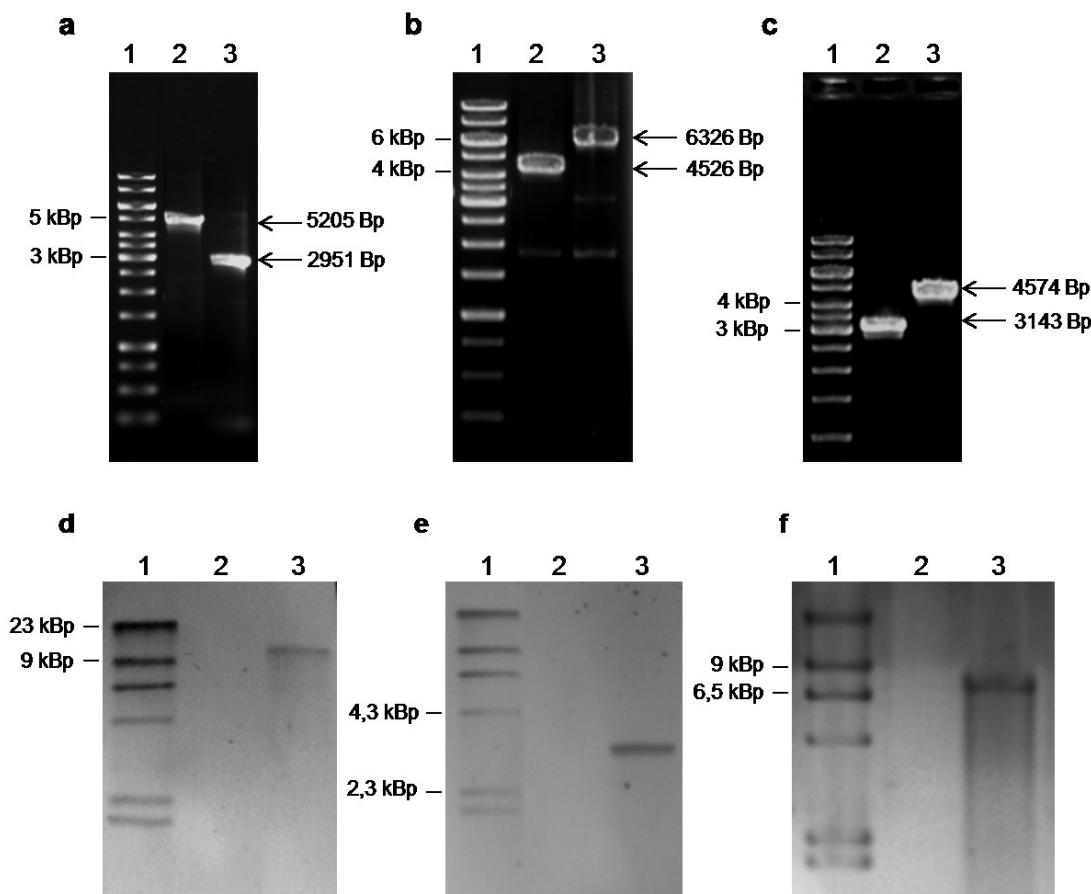


Abb. 3.5: Verifikation der Mutanten Δfru , $manI::int$ und $\Delta manII$ mittels PCR-Analyse und Southern Hybridisierung. Die PCR-Analysen (a-c) wurden mit Operon-flankierenden Primern durchgeführt. Vor Durchführung der Southern Blots wurde die DNA zunächst hydrolysiert mit $ClaI$ (d), $HhaI$ und $NcoI$ € oder $BcuI$ (f). Für die Southern Hybridisierung dienten zum einen Operon-spezifische Sonden (d: *cac0234*-Sonde, f: *cap0067*-Sonde) sowie eine ErmRAM-spezifische Sonde (e). (a) Spur 1: Längenstandard (1 kb ladder), Spur 2: WT, Spur 3: Δfru ; (b) Spur 1: Längenstandard (1 kb ladder), Spur 2: WT, Spur 3: $manI::int$; (c) Spur 1: Längenstandard (1 kb ladder), Spur 2: $\Delta manII$, Spur 3: WT; (d) Spur 1: DIG-labeled molecular weight marker II, Spur 2: Δfru , Spur 3: WT; (e) Spur 1: DIG-labeled molecular weight marker II, Spur 2: WT, Spur 3: $manI::int$; (f) Spur 1: DIG-labeled molecular weight marker II, Spur 2: $\Delta manII$, Spur 3: WT.

3.3 Plasmid-basierte Komplementation von *C. acetobutylicum* Δfru

Hauptaugenmerk der nachfolgenden Charakterisierungen der Mutanten lag auf der Untersuchung der Deletionsmutante Δfru , da das *fru*-Operon das putative „Haupt“-PTS für Fruktose codiert. Deshalb wurde in dem Stamm *C. acetobutylicum* Δfru eine Plasmid-basierte Komplementation durchgeführt, um eine Wiederherstellung der Funktion des *fru*-Operons zu gewährleisten. Als Vektorsystem für die Komplementation wurde der Vektor pThydA-catP (Abb. 3.6) gewählt. Dieser Vektor ist ein Derivat des Plasmids pThydA (Girbal *et al.*, 2005) und unterscheidet sich von diesem dadurch, dass er eine

Chloramphenicol-Resistenz anstelle der ursprünglichen Erythromycin-Resistenz aufweist (Mandy Wietzke, Universität Rostock, unveröffentlicht). In frame inserierte Proteine können mit einem C-terminalen *Strep*-TagII® versehen werden, welches eine Aufreinigung des erhaltenen Fusionsproteins ermöglicht, sowie dessen Detektion im Western Blot. Weiterhin vermittelt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz und besitzt sowohl einen Replikationsursprung für Gram-negative (ori) als auch für Gram-positive Bakterien (repL). Die Expression des klonierten Gens bzw. Operons unterliegt der Kontrolle durch den konstitutiven Thiolase-Promotor (*thl*-Promotor) aus *C. acetobutylicum*.

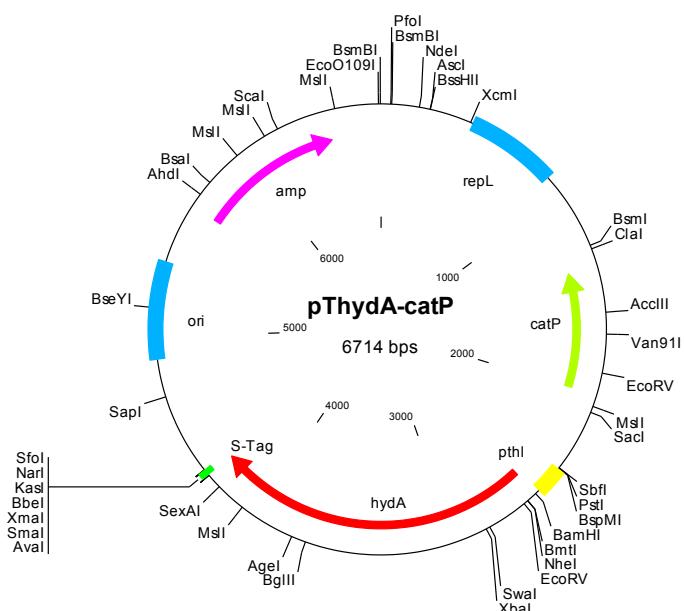


Abb. 3.6: Plasmidkarte von pThyDА-catP. Dargestellt ist der Vektor pThyDА-catP. Farblich hervorgehoben sind die Ampicillin- (lila) sowie die Chloramphenicolresistenz (hellgrün), der *thl*-Promotor (gelb), das *hydA*-Gen (rot), welches spezifisch ausgetauscht wurde und der C-terminale ,*Strep*-tagII (grün).

3.3.1 Konstruktion des Komplementationssplasmides pTfru-catP

Um das Komplementationssplasmid herzustellen, wurde das *hydA*-Gen (1738 Bp) des Vektors in frame durch das *fru*-Operon (3600 Bp) ausgetauscht. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Amplifikation des *fru*-Operons mit spezifischen Primern, welche zusätzlich für die spätere Ligation in den Zielvektor die notwendigen Restriktions-schnittstellen (*Bgl*II und *Cfr*9I) aufwiesen. Simultan wurde der Vektor pThy*dA*-catP durch Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Cfr*9I vorbereitet. Nach der Ligation (2.8.1.3) und Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (2.9.1) konnte eine

Selektion mit Ampicillin oder Chloramphenicol durchgeführt werden. Die Bestätigung positiver Klone ließ sich durch eine anschließende Plasmid-Isolierung (2.7.1) und nachfolgende Kontrollrestriktion mit *Cfr*9I (Abb. 3.7) realisieren. Es zeigte sich, dass alle isolierten Klone positiv waren und ein Fragment von 8573 Bp aufwiesen, welches dem linearisierten rekombinanten pTfru-catP entsprach. Zudem wurden die DNA-Sequenz zweier Klone (#1 und #4; LGC Genomics, Berlin) bestätigt, bevor sie für die Komplementation von *C. acetobutylicum* Δ fru eingesetzt wurden.

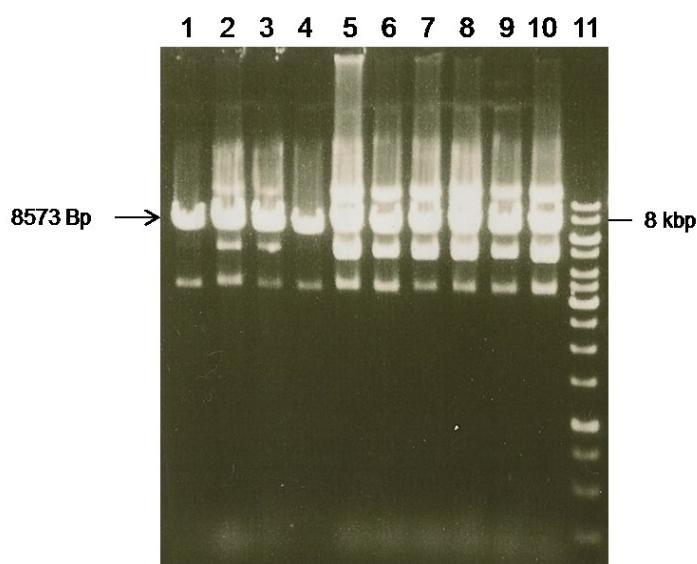


Abb. 3.7: Restriktionsanalyse von pTfru-catP-Klonen mit Cfr9I. Dargestellt ist Plasmid-DNA rekombinanter Klone 1-10 (Spur 1-10) nach der Hydrolyse mit Cfr9I (*Xma*I), aufgetrennt in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel mit einem Längenstandard (1 kb ladder, Spur 11).

3.3.2 Homologe Expression des *fru*-Operons in *C. acetobutylicum* Δ fru

Wie bereits unter 3.2.3 beschrieben, wurden die Plasmide vor ihrer Transformation in *C. acetobutylicum* Δ fru *in vivo* methyliert. Die Selektion auf positive Transformanden erfolgte mit Hilfe von Erythromycin und Thiamphenicol. Den Nachweis der aktiven Plasmid-basierten Expression des Operons lieferte die Western Blot Analyse (2.11.5) des isolierten Gesamtproteins (2.11.1) von vier verschiedenen Klonen. Die Abb. 3.8 zeigt sowohl die Auftrennung des Gesamtproteins in der SDS-PAGE (2.11.4.1) als auch die Detektion mittels Western Blot. Das gesamte Operon (Abb. 3.1) codiert für vier Proteine, die insgesamt eine Größe von ca. 128 kDa umfassen. Da das zur Detektion benötigte Strep-TagII[®] allerdings nur an dem C-Terminus des letzten Proteins (FruD) fusioniert wurde, konnte auch nur dieses in dem Western Blot nachgewiesen werden. Der Western Blot zeigt eindeutig das Protein FruD (Cac0234, Enzym II BC), welches als

Monomer eine Größe von ca. 48 kDa aufweist und den *Strep*-TagII®. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass das *fru*-Operon vollständig von dem Plasmid transkribiert und damit auch die anderen drei Proteine homolog in *C. acetobutylicum* gebildet wurden. Somit konnte der Komplementationstamm *C. acetobutylicum* *Δfru_compl* nach erfolgreicher Herstellung für weitere Analysen herangezogen werden.

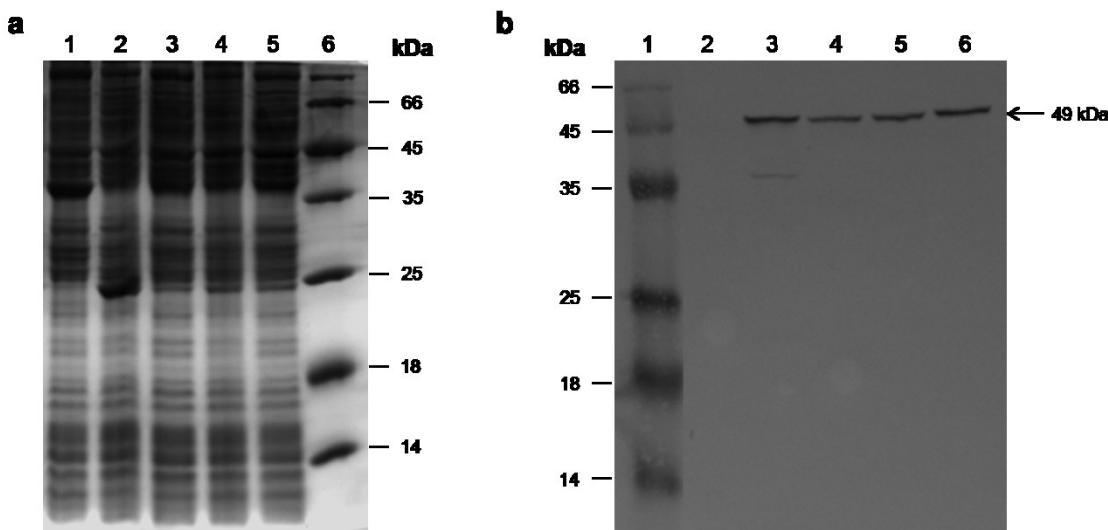


Abb. 3.8: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von *C. acetobutylicum* *Δfru_compl*. (a) Dargestellt ist das Gesamtproteinmuster aus *C. acetobutylicum* *Δfru* (Spur 1) und vier Klonen von *C. acetobutylicum* *Δfru_compl* (Spur 2-5) zusammen mit einem Größenstandard (Spur 6; Prestained Molecular Weight Marker) in einem 12 %igen Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. Der entsprechende Western Blot (b) zeigt für den Parentalstamm *Δfru* (Spur 2) keine Bande und in den Komplementanten (Spur 3-6) eine Bande mit der Größe von ca. 49 kDa, welche der Größe des *Strep*-TagII-Fusionsproteins FruD (CAC0234) entspricht.

3.4 Charakterisierung der Defektmutanten von *C. acetobutylicum*

Die Erstellung der drei Defektmutanten *Δfru*, *manI::int* und *ΔmanII* (3.2) stellte den initialen Schritt zur Charakterisierung der einzelnen Phosphotransferase Systeme (PTS^{Fru} , PTS^{ManI} , $\text{PTS}^{\text{ManII}}$) dar. Jeder dieser drei Stämme ist durch den Funktionsverlust eines dieser PTS gekennzeichnet. Um Rückschlüsse auf die einzelnen Funktionen der drei Phosphotransferase Systeme ziehen zu können, wurden die Mutanten hinsichtlich ihres Vermögens verschiedene Kohlenstoffquellen umzusetzen wachstumsphysiologisch charakterisiert. Das Hauptaugenmerk lag dabei in der Analyse des Wachstums mit Fruktose als Substrat, um der Frage nachzugehen inwieweit die drei PTS in dessen Umsatz involviert sind. Alle nachfolgenden Wachstumsversuche und daraus resultierende Parameterbestimmungen wurden mindestens als unabhängige Triplikate durchgeführt, um eine statistische Auswertbarkeit zu ermöglichen.

3.4.1 Glukose-Fermentation in statischen Kulturen

Zur ersten Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Stämme in statischen Kulturen (2.5.3) wurden diese im Minimalmedium MS-MES (2.3.2) über einen Zeitraum von 156 h bei 37 °C kultiviert und beprobt. Die Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle sollte Aufschluss darüber geben, ob und inwieweit bereits unter Standardbedingungen Defizite bzw. Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp vorlagen (Abb. 3.9).

Anhand der optischen Dichte (OD_{600}) konnten Einblicke über das Bakterienwachstum gewonnen werden. Die berechneten Wachstumsraten μ (2.6.4) von $0,164 \text{ h}^{-1}$ (Δfru), $0,160 \text{ h}^{-1}$ ($manI::int$) und $0,162 \text{ h}^{-1}$ ($\Delta manII$) zeigten nur geringfügige Differenzen gegenüber der des Wildtyps mit $0,166 \text{ h}^{-1}$ (Abb. A.4). Mit dem Übergang vom exponentiellen zum stationären Wachstum erreichte das Bakterienwachstum der Defektmutanten sein Maximum nach ca. 60 h. Die geringste OD_{600} erzielte die Mutante $manI::int$ mit einem Wert von 5,8. Die OD_{Max} der Deletionsstämme Δfru (6,3) und $\Delta manII$ (6,56) war vergleichbar mit der des Wildtyps von 6,5. Der Wildtyp erreichte seine OD_{Max} allerdings erst nach 100 h. Die sogenannte Absterbephase ist oft durch einen Rückgang in der optischen Dichte gekennzeichnet. Diese war bei den Mutanten deutlich stärker ausgeprägt war als beim Wildtyp (Abb. 3.9a) und resultierte in erheblich geringeren finalen optischen Dichten der Mutanten, die mit Werten von ca. 2 der Hälfte derjenigen des Wildtyps entsprach. Der rapideste Abfall in der OD_{600} konnte für die Mutante Δfru verzeichnet werden. Ein weiterer Parameter der neben der OD_{600} gemessen wurde war der extrazelluläre pH-Wert der Kulturen. Dieser lag zu Beginn des Wachstums bei einem Wert von etwa 5,2 und sank mit dem exponentiellen Wachstum aufgrund der Säureproduktion (Acetat und Butyrat) ab. Mit der Umstellung des Metabolismus von der Säure- zur Lösungsmittelproduktion (Abb. 1.1) stieg der pH-Wert leicht an, bevor er sich dann bei allen Stämmen etwa bei einem Wert von 4,6 einstellte. Im Hinblick auf den zeitlichen pH-Verlauf der Kulturen während des Wachstums (Abb. 3.9b) zeigten sich nur leichte Unterschiede.

Die Verwertung der Glukose als Kohlenstoffquelle konnte indirekt über die Bestimmung der verbliebenen Menge an Ausgangssubstrat im Medium ermittelt werden. Während des exponentiellen Wachstums ließ sich für alle untersuchten Stämme eine simultane Aufnahme der Glukose erkennen, wenngleich die Defektmutanten zu einem geringfügig schnelleren Konsum in der Lage waren. Einhergehend mit dem Eintritt in die Absterbephase reduzierte sich auch der Verbrauch von Glukose in den Defektmutanten. Während diese bereits nach 100 h nahezu 75 % der Glukose (60 g/l) konsumiert hatten,

so verfügte der Wildtyp noch über ca. die Hälfte der Ausgangsmenge. Nach 156 h Wachstum konnten jedoch für alle Stämme mit 5-10 g/l ähnliche Restmengen an Glukose im Medium gemessen werden (Abb. 3.9c).

Durch die teilweise enormen Unterschiede in der finalen optischen Dichte wurde zur Beurteilung der Menge an gebildeten Fermentationsendprodukten eine Normierung der Werte auf eine OD₆₀₀ von 1 vorgenommen. Im Allgemeinen erzielten alle Defektmutanten vergleichbare Mengen an Säuren und Lösungsmitteln als Endprodukte (Abb. 3.9d). Dennoch zeigten sich in der Lösungsmittelproduktion in dem Stamm *ΔmanII* Unterschiede zum Wildtyp in Form ihrer gesteigerten Bildung, die allerdings als nicht signifikant zu bezeichnen war. *C. acetobutylicum* *Δfru* und *manI::int* bildeten indes weniger Aceton und Butanol als der Wildtyp. Demnach konnten keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Verwertung von Glukose als C-Quelle in den statischen Kulturen der Defektmutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

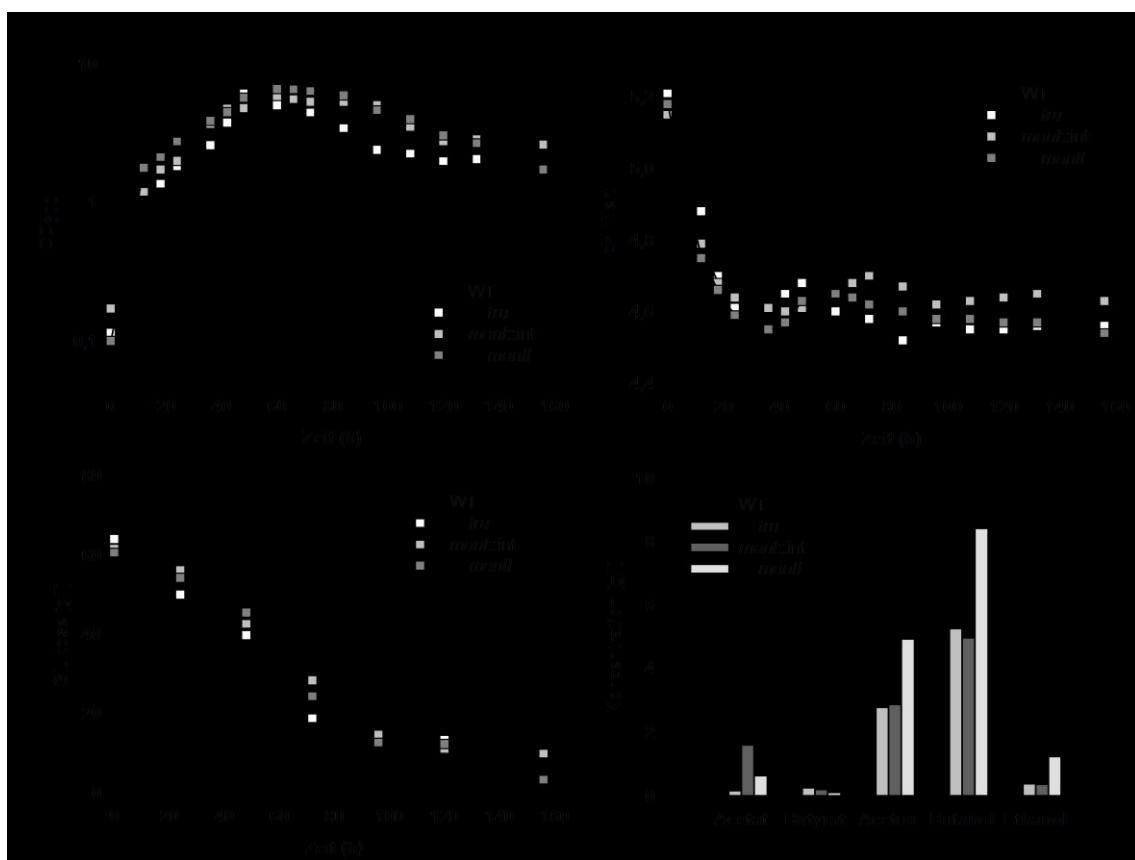


Abb. 3.9: Wachstum, Glukose-Gerbrauch und Fermentationsendprodukte der *C. acetobutylicum* Defektmutanten *Δfru*, *manI::int* und *ΔmanII* vergleichend zum Wildtyp. Über einen Zeitraum von 156 h bei 37 °C wurden in 200 ml MS-MES-Kulturen mit Glukose (60 g/l) als C-Quelle sowohl das Wachstum durch Messung der optischen Dichte (a) und des pH-Wertes (b) beobachtet, als auch die Konzentration der Glukose im Medium (c) enzymatisch sowie die Fermentationsendprodukte gaschromatographisch bestimmt. Die Mittelwerte der gebildeten Fermentationsendprodukte (d) wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 normalisiert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus Triplikaten (n=3). Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

3.4.2 Fruktose-Fermentation in statischen Kulturen

Die Analyse der Fermentation von Fruktose als einziger Kohlenstoffquelle erfolgte gleichermaßen wie für Glukose beschrieben (3.4.1). Die statischen Kulturen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt und unterschieden sich lediglich in ihrer C-Quelle.

Die einzelnen Parameter des Wachstums der Defektmutanten im Vergleich zum Wildtyp sind in der Abbildung 3.10 dargestellt. Bei Betrachtung des Verlaufs der optischen Dichte (Abb. 3.10a) zeigte sich, dass der Stamm *C. acetobutylicum* Δfru deutlich langsamer wuchs als die anderen Stämme und eine verlängerte exponentielle Wachstumsphase aufwies. Dies spiegelte sich auch in einer verminderten Wachstumsrate $\mu_{\Delta fru} = 0,067 \text{ h}^{-1}$ wider, die gegenüber der des Wildtyps ($\mu_{WT} = 0,139 \text{ h}^{-1}$) um 52 % reduziert war (Abb. A.4). Daraus ergab sich für den *fru*-negativen Stamm eine mehr als doppelt so lange Verdopplungszeit (2.6.4) von 10,35 h vergleichend zu der des Wildtyps (4,25 h). Für die anderen beiden Stämme konnten leicht verminderte Wachstumsraten festgestellt werden ($\mu_{manI::int} = 0,123 \text{ h}^{-1}$ und $\mu_{\Delta manII} = 0,138 \text{ h}^{-1}$). Darüber hinaus erreichte Δfru mit einem Wert von 3,08 die niedrigste maximale OD₆₀₀ aller untersuchten Stämme ($\mu_{manI::int} = 5,6$ und $\mu_{\Delta manII} = 6,6$), welche sich damit signifikant zur OD_{Max} von 6,66 des Wildtyps unterschied (Tab. A.1). Während $\Delta manII$ seine maximale OD₆₀₀ bereits nach ca. 60 h erreichte, so konnten für den Wildtyp und *manI::int* ähnliche Werte erst nach 120 h detektiert werden. Des Weiteren konnten für die Deletionsstämme (Δfru und $\Delta manII$) ausgeprägte Absterbephasen beobachtet werden. Dabei wurden finale optische Dichten von etwa 1,5 erreicht, während der Wildtyp und *manI::int* eine End-OD₆₀₀ von 5-6 aufwiesen. Anhand des pH-Verlaufes (Abb. 3.10b) konnte für alle Stämme, mit Ausnahme von Δfru , ein Lösungsmittelshift durch erneuten Anstieg des pH-Wertes nachvollzogen werden. In der Mutante $\Delta manII$ setzte dieser nach ca. 20 h Wachstum bereits deutlich früher ein. Die Abnahme des pH-Wertes von Δfru während der exponentiellen Wachstumsphase war in Korrelation zum verminderten Wachstum deutlich langsamer. Ein erneuter Anstieg des pH-Wertes wie für *manI::int*, $\Delta manII$ und den Wildtyp war für Δfru indes nicht erkennbar. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass der finale pH-Wert von Δfru im Vergleich zu den anderen Stämmen um eine ganze pH-Einheit niedrigerer war.

Die Bestimmung der Fruktose-Konzentration im Medium konnte mit Hilfe eines Fruktose-Kits gemessen werden (2.6.6). In Anbetracht des Fruktose-Verbrauchs konnte zwischen drei verschiedenen Typen von Kurven unterschieden werden (Abb. 3.10c).

Besonders auffällig war, dass die Fruktose vom Stamm Δfru mit einer sehr langsamen Rate aus dem Medium aufgenommen und lediglich 10 % der Ausgangsmenge von 60 g/l verbraucht wurden. Demgegenüber ließ die Insertionsmutante $manI::int$ keine Unterschiede zum Wildtyp erkennen. Beide Stämme konsumierten bis zu 50 g/l Fruktose, welches einer Menge von etwa 90 % entspricht. Interessanterweise stieg die Aufnahmerate nach ca. 96 h deutlich an. Zu diesem Zeitpunkt war Δfru bereits nicht mehr dazu in der Lage Fruktose aufzunehmen. Die schnellste Aufnahme von Fruktose während des Wachstums konnte für den Stamm $\Delta manII$ festgestellt werden. Nach 96 h wies dieser bereits eine ähnliche minimale Konzentrationen an Fruktose im Medium auf, wie für die finalen Werte des Wildtyps und des Stammes $manI::int$ beschrieben.



Abb. 3.10: Wachstum, Fruktose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der *C. acetobutylicum* Defektmutanten Δfru , $manI::int$ und $\Delta manII$ vergleichend zum Wildtyp. Über einen Zeitraum von 156 h bei 37 °C wurden in 200 ml MS-MES-Kulturen mit Fruktose (60 g/l) als C-Quelle sowohl das Wachstum durch Messung der optischen Dichte (a) und des pH-Wertes (b) beobachtet, als auch die Konzentration der Fruktose im Medium (c) enzymatisch und die Fermentationsendprodukte gaschromatographisch bestimmt. Die Mittelwerte der gebildeten Fermentationsendprodukte (d) wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 normalisiert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens fünf Replikaten ($n \geq 5$). Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz α wurde mit dem Student t -Test (ungepaart) berechnet und wurde als p -Wert angegeben: * $p < 0.05$ (geringfügig signifikant), ** $p < 0.01$ (sehr signifikant), *** $p < 0.001$ (hoch signifikant).

Wie bereits für das Wachstum mit Glukose als C-Quelle angewandt, so wurden auch hier die gemessenen Fermentationsendprodukte auf eine optische Dichte von 1 normalisiert (Abb. 3.10d). Die Inaktivierung des PTS^{ManI} führte zu keiner Veränderung der gebildeten Fermentationsendprodukte. Die Endwerte der Säuren Acetat und Butyrat betreffend ließ sich für den Stamm $\Delta manII$ nur eine geringfügige Erhöhung feststellen. Demgegenüber zeigten sich durch die Deletion des *fru*-Operons bis zu 10-fach erhöhte Mengen an Acetat und Butyrat ermitteln lassen. Bei der Betrachtung der Lösungsmittelproduktion war auffällig, dass für den Stamm $\Delta manII$ signifikant erhöhte Level an Aceton und Butanol nachweisbar waren. Der funktionale Verlust des *fru*-Operons führte zu einer drastisch reduzierten Lösungsmittelbildung. Butanol war zu keinem Zeitpunkt der Kulturführung detektierbar und Ethanol und Aceton konnten nur in signifikant geringen Mengen gemessen werden.

In Anbetracht des eingeschränkten Wachstums mit Fruktose als Substrat und des Unvermögens der Deletionsmutante Δfru unter diesen Bedingungen Lösungsmittel zu produzieren, wurde eine Plasmid-gestützte Komplementation (3.3) vorgenommen, um die entstandenen Wachstumsdefizite wieder auszugleichen. Diese sollte als Nachweis dafür dienen, dass die Unterschiede im Fermentationsprofil lediglich auf die Deletion des *fru*-Operons zurückzuführen sind und nicht eine Folge von polaren Effekten waren (Heap *et al.*, 2009). Das Wachstum, der Fruktose-Verbrauch sowie die Fermentationsendprodukte des Komplementationsstammes Δfru_compl sind ebenfalls der Abbildung 3.10 zu entnehmen. Durch die homologe Expression des *fru*-Operons in diesem Stamm ließ sich der ursprüngliche Phänotyp des Wildtyps weitestgehend wieder herstellen. Zum einen wies der Stamm Δfru_compl eine mit der des Wildtyps vergleichbare Wachstumsrate auf ($0,126 \text{ h}^{-1}$), obwohl der Verlauf und das Maximum der optischen Dichte im weiteren zeitlichen Verlauf der des Parentalstammes Δfru glich (Abb. 3.10a). Auch das Absinken des pH-Wertes war innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase zunächst schneller, doch ab ca. 110 h erreichten beide Stämme ähnlich niedrige Werte (Abb. 3.10b). Die Komplementante Δfru_compl zeigte in den ersten 100 h eine zum Wildtyp simultan verlaufende Aufnahme der Fruktose und war final mit einer Aufnahme von ca. 20 g/l zwischen der des Wildtyps und des Parentalstammes Δfru einzuordnen (Abb. 3.10c). Darüber hinaus konnte die Fähigkeit zur Lösungsmittelproduktion durch die Komplementation rekonstruiert werden, obwohl immer noch eine signifikant erhöhte Säureproduktion vorlag (Abb. 3.10d).

3.4.3 Mannose-Fermentation in statischen Kulturen

Die Daten der Fruktose-Fermentation zeigten, dass die beiden Man-PTS nur in geringem Maße in die Aufnahme von Fruktose involviert sind. Demnach wurde vermutet, dass beide Systeme hauptsächlich an der Aufnahme einer anderen C-Quelle beteiligt sind. Im Allgemeinen besitzen Man-PTSS ein breites Substratspektrum (Tangney und Mitchell, 2005). Aufgrund ihrer Homologie zu Mannose-PTSS lag die Vermutung nahe, dass sie als solche an der Aufnahme von Mannose beteiligt sind. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit erfolgte daher die Analyse der Mannose-Fermentation der Defektmutanten. Die nachfolgende Abbildung 3.11 illustriert die erzielten Ergebnisse der Mannose-Fermentation.

Im Vergleich des Wachstums von Wildtyp und dem Stamm *manI::int* zeigte sich eine um 45 % reduzierte Wachstumsrate ($\mu_{WT} = 0,120 \text{ h}^{-1}$ und $\mu_{manI::int} = 0,066 \text{ h}^{-1}$) für die Insertionsmutante (Abb. A.4). Dennoch erzielten beide Stämme eine maximale optische Dichte von 3,7 (Abb. 3.11a). Die Deletionsstämme Δfru und $\Delta manII$ wiesen dem Wildtyp gegenüber nur geringfügig höhere Wachstumsraten auf ($\mu_{\Delta fru} = 0,126 \text{ h}^{-1}$ und $\mu_{\Delta manII} = 0,125 \text{ h}^{-1}$). Die höchste OD_{Max} erreichte $\Delta manII$ mit einem Wert von 5,38 nach 70 h Kultivierung und lag damit um ca. 2 OD-Einheiten über denjenigen der anderen Stämme. Eine drastische Verringerung der OD₆₀₀ in der Absterbephase, wie es teilweise in der Glukose- und Fruktose-Fermentation zu beobachten war, konnte lediglich für den Stamm $\Delta manII$ dokumentiert werden. Das Absinken des pH-Wertes in der exponentiellen Wachstumsphase auf einen Wert von ca. 4,6 war bei allen Stämmen erkennbar. Für die Insertionsmutante *manI::int* dauerte dies jedoch länger, aufgrund ihres defizitären Wachstums. Der pH-Verlauf des Wildtyps sowie der Δfru - und $\Delta manII$ -Kulturen war während der stationären Phase vergleichbar und eine erneute pH-Zunahme konnte nicht detektiert werden. Für diese Kulturen ließ sich ein finaler pH von etwa 4,4 ermitteln. Das Eintreten in die Lösungsmittelphase konnte anhand eines Anstieges des pH-Wertes hingegen nur für den Stamm *manI::int* nachvollzogen werden. Dieser stieg auf einen Wert von 4,8 an und verblieb dort bis zum Ende der Fermentation (Abb. 3.11b).

Der höchste Verbrauch an Mannose während des Wachstums konnte für die Insertionsmutante *manI::int* beobachtet werden. Dies war einhergehend mit einer signifikant erhöhten Lösungsmittelproduktion. Demnach wurden 2-fache Mengen an Aceton und 3-fache Mengen an Ethanol und Butanol im Vergleich zum Wildtyp detektiert (Abb. 3.11d). Auch die Deletionsmutante $\Delta manII$ produzierte höhere Mengen an Lösungsmitteln, wenngleich der Funktionsverlust des *manII*-Operons zu einem eingeschränkten

Konsum von Mannose führte. Demgegenüber führte die Deletion des *fru*-Operons zu einer signifikant eingeschränkten Aufnahme von Mannose. Die Δfru -Mutante konnte nur ca. ein Drittel der Mannose verwerten (Abb. 3.11c). Damit einhergehend wurden signifikant erhöhte Mengen an Säuren und eine Verringerung der Lösungsmittelbildung detektiert.



Abb. 3.11: Wachstum, Mannose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der *C. acetobutylicum* Defektmutanten Δfru , *manI::int* und $\Delta manII$ vergleichend zum Wildtyp. Über einen Zeitraum von 156 h bei 37 °C wurden in 200 ml MS-MES-Kulturen mit Mannose (60 g/l) als C-Quelle sowohl das Wachstum durch Messung der optischen Dichte (a) und des pH-Wertes (b) beobachtet, als auch die Konzentration der Mannose im Medium (c) enzymatisch und die Fermentationsendprodukte gaschromatographisch bestimmt. Die Mittelwerte der gebildeten Fermentationsendprodukte (d) wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 normalisiert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens fünf Replikaten ($n \geq 5$). Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz α wurde mit dem Student *t*-Test (ungepaart) berechnet und wurde als *p*-Wert angegeben: * $p < 0.05$ (geringfügig signifikant), ** $p < 0.01$ (sehr signifikant), *** $p < 0.001$ (hoch signifikant).

Ein allgemeiner Vergleich des Wachstums und der Lösungsmittelproduktion mit den drei untersuchten Substraten als C-Quelle (Abb. A.4, Tab. A.1) lieferte sowohl für die Glukose- als auch die Fruktose-Fermentation generell höhere Ausbeuten. Für die Mannose-Fermentation hingegen blieben die ermittelten Werte deutlich zurück.

3.5 Regulation der Fruktose-Aufnahme

Die wachstumsphysiologischen Charakterisierungen der Defektmutanten Δfru , $manI::int$ und $\Delta manII$ (3.4) offenbarten, dass eine effiziente Nutzung von Fruktose strikt an das Vorhandensein eines funktionsfähigen PTS^{Fru} gebunden ist. Eine vollständige Inhibition der Fruktoseaufnahme konnte durch den einzelnen funktionalen Knock-Out des PTS^{Fru} nicht erzielt werden. Somit zeigte sich, dass die beiden Man-PTS zwar an der Aufnahme von Fruktose beteiligt sein können, das Fehlen des PTS^{Fru} allerdings nicht vollständig zu kompensieren vermögen. Die Deletion des *fru*-Operons führte dennoch nicht zu einem Fruktose-negativen Phänotyp. Ein Grundumsatz von Fruktose (<10 g/l) war weiterhin vorhanden, doch reichte dieser nicht für die Produktion von Lösungsmitteln aus. Demnach konnte die Vermutung bestätigt werden, dass das PTS^{Fru}, codiert durch das *fru*-Operon, hauptsächlich für die Fruktoseaufnahme und dessen Umsatz verantwortlich ist. Weiterhin zeigte sich, dass die beiden PTS^{Man} sekundär in die Aufnahme von Fruktose involviert sind und ihre Hauptaufgabe wohl eher in der Verwertung von Mannose liegt. Ein Vergleich des Wachstums von *C. acetobutylicum* Δfru mit Glukose (3.4.2) oder Fruktose (3.4.3) als C-Quelle ließ darauf schließen, dass das PTS^{Fru} eine Substratspezifität für Fruktose besitzt. Inwieweit die Fruktoseaufnahme hingegen reguliert wird, konnte anhand der bisher erzielten Ergebnisse nicht geklärt werden. Diesbezüglich sollten weiterführende Analysen des *fru*-Operons erfolgen.

Generell kann eine Regulation des Zuckerkatabolismus auf zwei Wegen erfolgen, durch die transkriptionelle Kontrolle und die Kontrolle der Proteinaktivität über den Mechanismus des Induktor-Ausschlusses (inducer exclusion) (Titgemeyer und Hillen, 2002). Die sequentielle Verwertung von Kohlenhydraten wird durch einen generellen Regulationsmechanismus, die sogenannte Katabolitrepression (CCR - Carbon catabolite repression) gewährleistet (Abb. 1.4). Dabei wird die transkriptionelle Regulation katabolischer Operone zumeist über eine globale und eine Substrat-spezifische Kontrolle sichergestellt (Guédon *et al.*, 2002). In *C. acetobutylicum* stellt Glukose die bevorzugte Kohlenstoffquelle dar (Tangney *et al.*, 2003), weshalb die Expression anderer Zuckerkatabolisierender Gene häufig durch die Anwesenheit von Glukose im Medium reprimiert wird. Das Phänomen der CCR wird in *C. acetobutylicum* durch das globale Regulatorprotein CcpA vermittelt (Ren *et al.*, 2010). Eine Substrat-spezifische Kontrolle erfolgt zumeist über individuelle Regulatoren, die sich zumeist in räumlicher Nähe zum jeweiligen katabolischen Operon befinden.

3.5.1 Der Aufbau des *fru*-Operons

Das *fru*-Operon (*cac0231-cac0234*) befindet sich auf dem Chromosom von *C. acetobutylicum* und codiert für vier offene Leserahmen (ORF, Abb. 3.1a). Neben den Untereinheiten des Enzyms II (*fruC*, *cac0233* und *fruD*, *cac0234*) findet sich auch ein ORF für eine 1-Phosphofruktokinase (*fruB*, *cac0232*) und einen „DeoR-type transcriptional regulator“ (*fruR*, *cac0231*), welcher das erste Gen dieses Operons darstellt. Basierend auf Sequenzanalysen codiert das *fru*-Operon mutmaßlich für die einzige 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) im gesamten Genom von *C. acetobutylicum*, welches ebenfalls für eine Substratspezifität für Fruktose spricht.

Zunächst erfolgten Northern Blot-Analysen (2.8.7.5), um zu klären ob die vier Gene tatsächlich in Form einer polycistronischen Transkriptionseinheit vorliegen und ob das *fru*-Operon Substrat-spezifisch induziert wird. Dafür wurde sowohl aus exponentiell gewachsenen Glukose- als auch aus Fruktose-Kulturen Gesamt-RNA isoliert (2.7.3) und jeweils 20 µg für die Transkriptanalyse eingesetzt (Abb. 3.12).

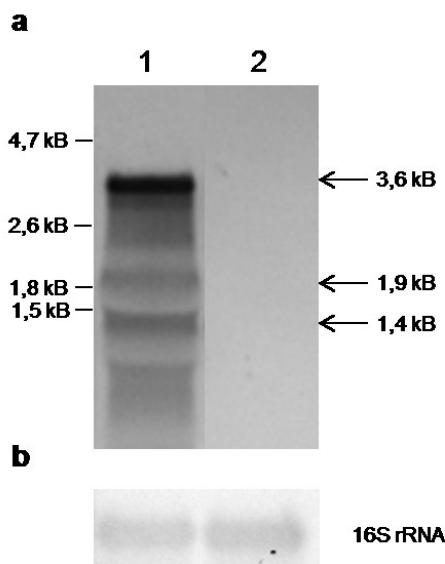


Abb. 3.12: Transkriptionsanalyse des *fru*-Operons in *C. acetobutylicum*. Zur Bestimmung der Transkriptmengen des *fru*-Operons im Wildtyp unter Fruktose- (Spur 1) bzw. Glukose-Bedingungen (Spur 2) wurden 20 µg Gesamt-RNA für den Northern Blot (a) eingesetzt und mit einer *fru*-Operon-spezifischen Sonde (*cac0234*) hybridisiert. Als Positivkontrolle für die Gewährleistung von gleichmäßigen Konzentrationsverhältnissen diente die Analyse der 16S rRNA (b) von jeweils 1 µg Gesamt-RNA pro Spur mit einer spezifischen Sonde.

Mit Hilfe der Transkriptionsanalyse des *fru*-Operons mittels Northern Blot konnte eindeutig seine Induzierbarkeit unter Anwesenheit von Fruktose im Medium demonstriert werden. Während unter Glukose-Bedingungen keine Transkripte detektierbar waren, so zeigte sich unter Fruktose-Bedingungen ein starkes Transkript von ca. 3,6 kB, welches

dem Umfang des gesamten *fru*-Operons entspricht. Weiterhin ließen sich zwei kleinere Banden erkennen, die potentiell der Größe der beiden Enzym II-Domänen (*fruC* und *fruD*; 1,9 kB) bzw. des einzelnen *fruD* (1,4 kB) entsprechen könnten. Dies deutet auf eine Prozessierung des gesamten Transkriptes hin. In folgenden Experimenten galt es nun herauszufinden, wie die Substrat-abhängige Induktion des *fru*-Operons reguliert ist.

3.5.2 FruR – ein putativer Regulator des Fruktose-Metabolismus

Einen ersten Ansatz zur Aufklärung der Regulation der Fruktose-Aufnahme stellte der putative Regulator FruR dar. Dieser wird von dem ersten Gen des *fru*-Operons *cac0231* codiert, umfasst 254 Aminosäuren und ist als „Transcriptional regulator of sugar metabolism“ annotiert (PRODORIC® Database, <http://prodoric.tu-bs.de/>). Das Protein FruR zeigt Sequenzhomologien zur Familie der „DeoR-type“-Regulatoren. DeoR-ähnliche Regulatoren kommen in diversen Bakterien als Regulatoren des Zucker- und Nukleosid-Metabolismus vor. Ein Charakteristikum dieser Proteine ist ihre hoch konservierte Größe von 240-260 Aminosäuren. Darüber hinaus besitzen sie am N-Terminus ein Helix-Turn-Helix (HTH-) – Motiv, welches sie zur Bindung von DNA befähigt, sowie eine C-terminale Induktor-Bindestelle oder aber Multimerisierungsdomäne. Regulatoren der DeoR-Familie binden an verschiedenen Operator-Bindestellen in der Promotorregion ihrer Zielgene (Elgrably-Weiss *et al.*, 2006).

3.5.3 Promotor-Analyse des *fru*-Operons

Der Promotor bakterieller Gene und Operone ist allgemein als ein Abschnitt der DNA definiert, der als Erkennungs- und Bindestelle der RNA-Polymerase dient. Er befindet sich am 5'-Ende der Transkriptionseinheit, also stromaufwärts (upstream) des translatierten Bereiches und ist für die Initiation der Transkription von essentieller Bedeutung. Die Grundelemente eines Promotors bilden die sogenannte -35-Region und -10-Region, die für eine Erkennung der RNA-Polymerase unerlässlich sind. Stromaufwärts und -abwärts dieser Regionen befinden sich DNA-Abschnitte, die die Bindung der RNA-Polymerase am Promotor beeinflussen können. Solche konservierten Sequenzmotive werden als Operator- bzw. Aktivator-Bindestelle bezeichnet und können mit bestimmten DNA-bindenden Proteinen in Wechselwirkungen treten, wodurch eine spezifische Regulation der Transkription erfolgt (Knippers, 2006).

Ein erster Schritt in der Analyse des Promotors des *fru*-Operons bestand zunächst in der Identifikation der hoch konservierten -35-Region und -10-Region. Beide Boxen konnten anhand von Sequenzvergleichen mit den Konsensussequenzen 5'-TATAAT-3' (-10-Box) und 5'-TTGACA-3' (-35-Box) ausfindig gemacht werden (Abb. 3.13; Knippers, 2006). Mit Hilfe der 5'-RACE Methode (2.8.6.5) konnte im Weiteren der Transkriptionsstartpunkt mit einer Entfernung von 56 Bp stromaufwärts des Startcodons und 6 Bp stromabwärts der -10-Region lokalisiert werden. Ein klassischer vegetativer Promotor befindet sich unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes, wobei der Abstand zwischen dem Transkriptionsstartpunkt und dem ersten Nukleotid der -10-Region 5-7 Bp beträgt (Knippers, 2006).

Des Weiteren konnte eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz (Ribosomenbindestelle, rbs) 5'-GAAAGG-3' ermittelt werden (Abb. 3.13), die leicht von der Konsensussequenz (5'-AGGAGG-3') abweicht und den Startpunkt der Translation darstellt (Shine und Dalgarno, 1974). Sie besteht generell aus einer Purin-reichen Sequenz (A und G) und liegt etwa sieben Nukleotide stromaufwärts des Startcodons (AUG). 19 Bp stromabwärts des letzten Gens *fruD* des *fru*-Operons befindet sich ein Rho-unabhängiger Transkriptionsterminator (Abb. 3.13), der sich unter Verwendung einer Suchmaschine <http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/> (Gautheret und Lambert, 2001; Macke *et al.*, 2001) identifizieren ließ.

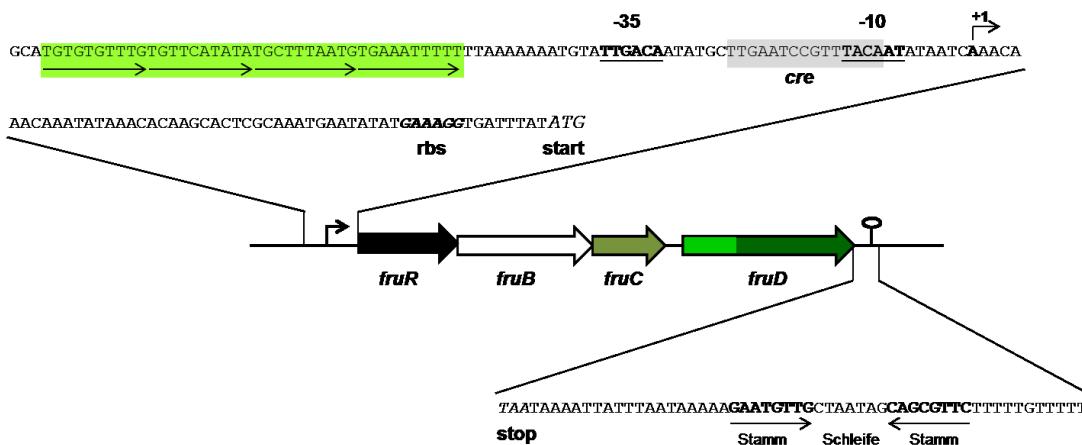


Abb. 3.13: Analyse des Promotorbereiches und des Terminators des *fru*-Operons in *C. acetobutylicum*. Schematisch dargestellt ist das *fru*-Operon aus *C. acetobutylicum* mit seinem Promotorbereich und seinem Rho-unabhängigen Transkriptionsterminator. Der Promotorbereich wurde dabei näher beleuchtet und beinhaltet alle identifizierten Charakteristika. Neben den beiden RNA-Polymerase-Erkennungssequenzen (-35-Box und -10-Box) in fetten unterstrichenen Lettern ist der Transkriptionsstartpunkt (+1, fett) gezeigt, sowie die Ribosomenbindestelle (rbs, fett kursiv) und der Translationsstartpunkt ATG (groß, kursiv). Des Weiteren sind die beiden putativen Bindestellen für den Regulator FruR (hellgrün) und CcpA (*cre*, grau) farbig hinterlegt. Die vier Pfeile in der FruR-Bindestelle deuten auf vier benachbarte 10-Bp-Wiederholungen hin aus denen sich das Motiv zusammensetzt. Die Terminatorstruktur befindet sich 20 Bp stromabwärts des Stop-Codons von *fruD*.

3.5.3.1 Identifikation von putativen Regulator-Bindestellen

Das Hauptaugenmerk in der Charakterisierung des Promotorbereiches des *fru*-Operons lag in der Identifizierung von putativen Bindestellen für transkriptionelle Regulatoren. Dabei wurde nach putativen Bindemotiven für den globalen Regulator CcpA als auch nach möglichen Bindestellen von einem sekundär Substrat-spezifischen Regulator FruR gesucht.

Das „Virtual Footprint - Tool“ der Prodoric-Datenbank (<http://www.prodoric.de/vfp/>) ist ein Programm mit dem Mustererkennungsalgorithmen von DNA-Bindestellen vorhergesagt werden können (Münch *et al.*, 2003). Dabei kann eine Zielsequenz sowohl mit bereits bekannten Bindestellen von Transkriptionsfaktoren aus anderen Organismen verglichen werden oder es können neue Motive als Bindestellen unbekannter Faktoren herausgearbeitet werden.

CcpA ist ein pleiotroper Regulator in Gram-positiven Bakterien, durch den viele Gene reprimiert werden, die an der Kohlenhydrat-Aufnahme und dessen Metabolismus beteiligt sind (Stülke und Hillen, 2000; Görke und Stülke, 2008). Die regulatorische Funktion von CcpA an seinen Zielgenen erfolgt direkt durch die Bindung an sogenannte „catabolite-responsive elements“ (*cre*-sites). Bei der *cre*-Erkennungssequenz handelt es sich um eine 15-Bp bzw. 16-Bp lange palindromische Sequenz in Übereinstimmung mit der Konsensussequenz 5'-WTGAAARCGYTTWNN-3' für *B. subtilis* (Fujita, 2009) bzw. 5'-WTGWAAACGWTWWCAW-3' für *C. acetobutylicum* (Ren *et al.*, 2012). Mit Hilfe dieser Sequenzen wurde der Promotorbereich des *fru*-Operons nach einer putativen *cre*-site durchsucht. 79 Bp stromaufwärts des Startcodons zwischen der -35-Box und der -10-Box konnte eine solche identifiziert werden (Abb. 3.13).

Für den putativen Regulator FruR war anhand von Sequenzvergleichen mit anderen Organismen kein einheitliches Bindemotiv zu finden. Ein Vergleich mit dem putativen Bindemotiv von FruR aus *Lactococcus lactis* (Barrière *et al.*, 2005), offenbarte schließlich eine mögliche Bindesequenz, die auch in anderen Gram-positiven Organismen wie *B. subtilis* und *Streptococcus pyogenes* konserviert vorzufinden war (Abb. 3.14). Dieses Motiv besteht aus 4 benachbarten 10-Bp-Wiederholungen, wobei die ersten beiden Basenpaare (TG) hoch konserviert vorliegen. Zudem ist es 13 Bp stromaufwärts der -35-Box des Promotors des *fru*-Operons gelegen (Abb. 3.13).

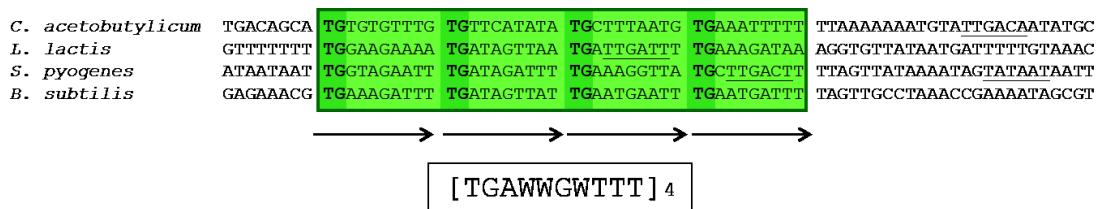


Abb. 3.14: Alignment der Promotorregion des *fru*-Operons in *C. acetobutylicum* mit den entsprechenden Homologen aus anderen Gram-positiven Organismen (Barrière et al. 2005; mod.). Der Sequenzvergleich zeigt das putative Bindemotiv für FruR (hellgrüne Box) bestehend aus vier benachbarten 10-Bp-Repeats (Pfeile), deren ersten beiden Basenpaare (TG, dunkelgrün) hoch konserviert vorliegen. Die unterstrichenen Sequenzen kennzeichnen die putative -35-Box bzw. -10-Box und weisen auf die Lokalisation im Promotorbereich hin. Des Weiteren ist das Konsensusmotiv unterhalb der Pfeile dargestellt.

3.5.4 Funktionelle Analyse des potentiellen Regulators FruR und des Regulators CcpA

Mit der Identifikation eines putativen Bindemotivs für die Proteine CcpA und FruR galt es nun herauszufinden, ob eine Bindung dieser Regulatoren an die jeweiligen Bereiche tatsächlich möglich war. Dafür wurden im Folgenden Promotor-Bindungsstudien mit Hilfe des Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA, 2.11.6) *in vitro* durchgeführt.

3.5.4.1 Klonierung und Heterologe Expression von FruR und CcpA in *E. coli*

Um die beiden Proteine CcpA und FruR für die Durchführung der Bindungsstudien in ausreichender Menge zu gewinnen, wurden diese zunächst durch eine Überexpression im heterologen System (*E. coli*) angereichert und isoliert (2.11.3). Die Konstruktion der Vektoren für die heterologe Expression erfolgte analog zu der Herstellung des Komplementationsplasmides pTfru-catP (3.3.1). Die jeweiligen Gene *cac0231* (*fruR*) und *cac3037* (*ccpA*) wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und durch die angefügten Restriktionsschnittstellen *Bam*H I und *Cfr*9I in den Vektor pT-catP kloniert. Die konstruierten Plasmide konnten anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert werden (2.9.1) und für die Gewinnung von möglichst reinen heterolog exprimierten Proteinen genutzt werden. Um eine hohe Quantität der Proteine FruR und CcpA zu erhalten, wurde jeweils ein positiver Klon in einem Volumen von 250 ml LB bei 30 °C über Nacht kultiviert. Die Reduktion der Temperatur sollte hierbei die Möglichkeit der Bildung von sogenannten „Inclusion Bodies“ (Einschlusskörperchen) minimieren (Wilkinson und Harrison, 1991). Nach dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (2.11.1) konnten die geklärten Zelllysate zur Affinitätschromatographie an *Strep*-Tactin-Sepharose

(2.11.3) verwendet werden. Um eine gelungene Anreicherung und Isolierung der Proteine FruR und CcpA nachzuweisen, wurden diese im SDS-Polyacrylamidgel sowie im Western Blot analysiert (Abb. 3.15). Für das Protein FruR–*Strep*-tagII zeigten sich in den Elutionsfraktionen (Abb. 3.15a) zwei Banden von etwa 26 und 27 kDa, eine sehr starke und eine schwächere daruntergelegene, welche der theoretisch ermittelten Größe von FruR entsprechen. Auch für CcpA–*Strep*-tagII war die heterologe Expression und Isolierung erfolgreich. Das aufgereinigte Fusions-Protein (Abb. 3.15b) wurde durch drei Banden zwischen 35 und 40 kDa repräsentiert, welche sich im Bereich des theoretisch kalkulierten Molekulargewichtes von 37,4 kDa befinden. Ein abschließender Nachweis erfolgte durch einen Western Blot, indem jeweils die dritte Elutionsfraktion für die spezifische Detektion eingesetzt wurde. Mit Hilfe des Bradford-Assays wurden die einzelnen Proteinkonzentrationen (2.11.2) in den Elutionsfraktionen ermittelt. Generell war die Ausbeute in den Elutionsfraktionen 2 bis 4 am höchsten. Für FruR konnten Ausbeuten bis zu 2 µg/µl erzielt werden, während die Proteinkonzentration für CcpA durchschnittlich 0,5 µg/µl betrug. Die Proteine wurden sofort für die Promotor-Bindungsstudien eingesetzt, allerdings war es auch möglich sie bei -20 °C über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen zu lagern.

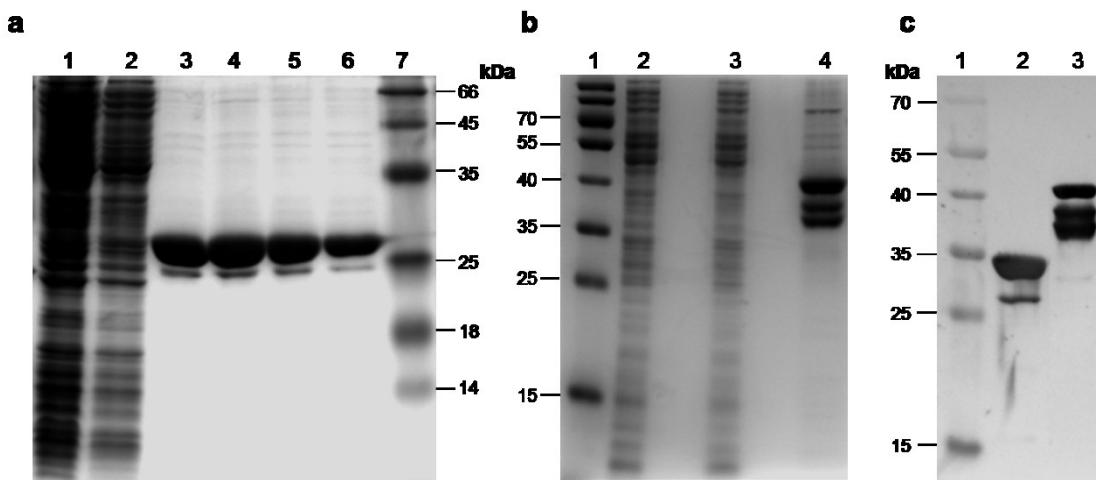


Abb. 3.15: Native Aufreinigung des FruR–*Strep*-tagII- und CcpA–*Strep*-tagII -Proteins aus Proteiextrakten nach heterologer Expression in *E. coli* DH5α. Gezeigt sind 12 %ige [w/v] SDS-Polyacrylamidgele nach Färbung mit kolloidalen Coomassie und ein Western Blot (c). Die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung an *Strep*-Tactin-Sepharose von FruR–*Strep*-tagII (a) und CcpA–*Strep*-tagII (b) wurden aufgetragen. A, Spur 1: Durchfluss nach Beladen der Säule, Spur 2: Waschfraktion, Spur 3-6: Elutionsfraktionen (2 bis 5), Spur 7: Größenstandard (Prestained Molecular Weight Marker); (b) Spur 1: Größenstandard (Prestained Molecular Weight Marker), Spur 2: Durchfluss nach Beladen der Säule, Spur 3: Waschfraktion, Spur 4: Elutionsfraktion 3; (c) Western Blot: Spur 1: Größenstandard (Prestained Molecular Weight Marker), Spur 2: FruR–*Strep*-tagII (Elutionsfraktion 3), Spur 3: CcpA–*Strep*-tagII (Elutionsfraktion 3).

3.5.4.2 Promotor-Bindungsstudien von FruR und CcpA *in vitro*

Eine geeignete Methode zur Durchführung von Promotor-Bindungsstudien stellt der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) dar. Dieser ermöglicht eine schnelle Untersuchung von Protein-Nukleinsäure-Komplexen. Prinzipiell wurde dafür das entsprechende Protein mit einem DNA-Fragment des Promotorbereiches des *fru*-Operons inkubiert, um anschließend in einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese eine Wechselwirkung des Proteins mit dem putativen Bindemotiv durch ein verändertes Laufverhalten beobachten zu können.

Für die EMASas wurde zunächst der Promotorbereich des *fru*-Operons (-203 Bp bis +65 Bp) mittels PCR (2.8.6.2) amplifiziert. Das Fragment mit einer Größe von 268 Bp beinhaltete sowohl die putative FruR-Bindestelle als auch die *cre*-Sequenz für CcpA. Als Negativ-Kontrolle wurde ein aufgereinigtes Amplifikat des Gens *cac2372* mit einer Größe von 264 Bp verwendet, welches von Daniela Wetzel (Universität Rostock) zur Verfügung gestellt wurde. Weder eine FruR-Bindestelle noch eine *cre*-Sequenz konnten in der Nukleotidsequenz dieses Gens gefunden werden. Zusätzlich diente ein 398 Bp großes Fragment des Promotorbereiches des Gens *xylB* (*cac2612*), welches für eine Xylulose Kinase codiert, als Positiv-Kontrolle für die Bindung von CcpA. Vorangegangene Arbeiten offenbarten eine negative Regulation von *xylB* durch die Bindung von CcpA an dessen Promotorbereich (Rodionov *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2010). Nach Aufreinigung der Amplifikate (Abb. 3.16) konnte deren Konzentration photometrisch bestimmt werden (2.8.5), um den Einsatz von gleichen Mengen in den EMASas gewährleisten zu können.

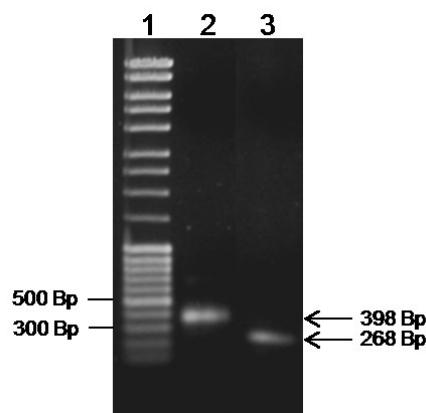


Abb. 3.16: Aufgereinigte PCR-Amplifikate ausgewählter Promotorbereiche. Die geleluuierten PCR-Fragmente der Promotorbereiche von *xylB* (Spur 2) bzw. *fru* (Spur 3) wurden zusammen mit einem Größenstandard (MassRuler DNA ladder Mix) in einem 1 %igen Agarosegel [w/v] aufgetragen.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Promotor-Bindungsstudien ist unter 2.11.6 beschrieben. Für die Analyse der Bindungsfähigkeit von FruR an die prognostizierte Promotorbindestelle wurde der Bindepuffer 1 (Toyoda *et al.*, 2008) verwendet. Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe kann sowohl in Agarosegelen als auch in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen erfolgen. Für die FruR-Bindungsstudien wurden beide Optionen getestet, wobei sich herausstellte, dass bei der Auftrennung in 6 %igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen kein verändertes Laufverhalten detektiert werden konnte. Vermutlich waren die gebildeten FruR-DNA-Komplexe nicht dazu in der Lage durch das Gel zu dringen und verblieben stattdessen in den Taschen des Gels. Demnach wurden alle folgenden Bindungsstudien mit FruR in 1,5 %igen TBE-Agarosegelen durchgeführt. Die Visualisierung der Digoxigenin-markierten DNA erfolgte nach dem Blotten des Gels auf eine Nylonmembran durch die Detektion der Chemilumineszenz mittels eines Immunoassays mit CDP-*Star* (2.8.7.7). Wie in der Abbildung 3.17 gezeigt ist, konnte für FruR eindeutig eine Interaktion mit dem Promotorbereich des *fru*-Operons nachgewiesen werden.

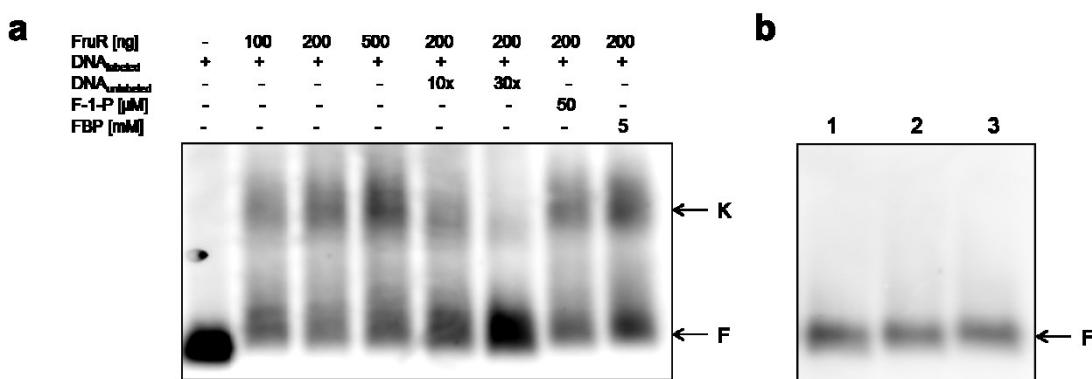


Abb. 3.17: Interaktion von FruR mit dem Promotorbereiche des *fru*-Operons. Der Nachweis der Bindung von FruR an seinen eigenen Promotorbereich (a) wurde mittels EMSA erbracht. Als Negativ-Kontrolle diente das aufgereinigte Amplifikat des Gens *cac2372* (b). Pro Ansatz wurden 0,4 ng markierte DNA verwendet und die in der Legende angegebenen Konzentrationen an Protein bzw. Effektoren (Fructose-1-Phosphat, F-1-P; Fructose-1,6-Bisphosphat, FBP). Die Auf trennung erfolgte in einem 1,5 %igen TBE-Agarosegel [w/v]. Nach dem Blotten der Gele auf eine Nylonmembran konnte die DNA durch die Detektion der Chemilumineszenz visualisiert werden. „F“ zeigt die freie DNA-Bande und „K“ den FruR-Strep-tagII -DNA-Komplex an.

Anhand der Abbildung 3.17a lässt sich erkennen, dass eine Erhöhung der Konzentration an FruR gleichermaßen zu einer Verstärkung der FruR-DNA-Komplexbildung führte. Des Weiteren resultierte die gesteigerte Zugabe von selbigem unmarkierten Promotorfragment in einer ebenso gesteigerten Zurückdrängung der markierten Komplexe (Spur 5 und 6), wodurch die Spezifität der Bindung bestätigt werden konnte. Eine Bindung von FruR an die DNA der Negativ-Kontrolle blieb aus (Abb. 3.17b).

Wie bereits erwähnt besitzen die DeoR-Regulatoren entweder eine C-terminale Effektor-Bindestelle oder aber eine Multimerisierungsdomäne. Als Effektor-Moleküle gelten generell phosphorylierte Intermediate des jeweilig relevanten Stoffwechselweges, welche die Bindung dieser Regulatoren *in vivo* oft beeinflussen. Im Falle des *fru*-Operons kämen als putative Effektoren Fruktose-1-Phosphat (F-1-P) oder Fruktose-1-6-Bisphosphat (FBP) in Frage. Deshalb wurde deren Einfluss auf die Bindung von FruR an seine Bindestelle getestet. Anhand vergleichbarer Studien (Ramseier *et al.*, 1995; Toyoda *et al.*, 2008) erwies sich die Zugabe einer geringen Menge an F-1-P (50 µM) bzw. einer hohen Menge an FBP (5 mM) als negativ auf die DNA-Bindung dieser DeoR-Regulatoren. Diese Beobachtungen ließen sich auf FruR aus *C. acetobutylicum* nicht übertragen. Durch die Zugabe von F-1-P bzw. FBP zu den Reaktionsansätzen zeigte sich keinerlei Einfluss auf die Bindung von FruR (Abb. 3.17a, Spuren 7 und 8) an die DNA. Weder eine Aufhebung des Shifts noch dessen Verstärkung konnte beobachtet werden. Dementsprechend kann über die Art der Regulation zu diesem Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden.

Die CcpA-Bindestudien wurden in dem Bindepuffer 2 (Antunes *et al.*, 2012) durchgeführt. Wie aus der Abb. 3.18a ersichtlich wird, konnte eine Bindung von CcpA an den Promotorbereich des *fru*-Operons ebenfalls bestätigt werden. Der Nachweis der Spezifität der Bindung konnte durch die Zugabe von unspezifischem Protein BSA zu allen Reaktionsansätzen verifiziert werden. Des Weiteren konnte somit ausgeschlossen werden, dass nur durch die bloße Zugabe von Protein das Laufverhalten während der Auftrennung im Polyacrylamidgel verändert wurde.

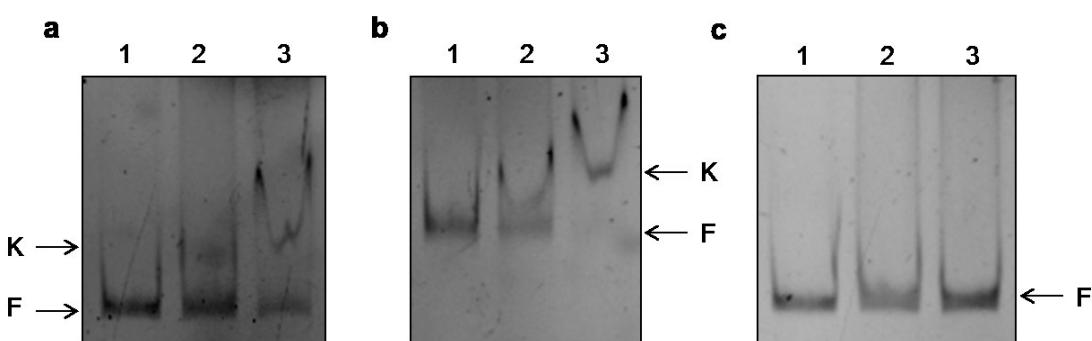


Abb. 3.18: Interaktion von CcpA–Strep-tagII mit den Promotorbereichen des *fru*-Operons und *xyLB*. Der Nachweis der Bindung von CcpA–Strep-tagII an den *fru*-Operon Promotorbereich (a) und *xyLB*-Promotorbereich (b) wurde mittels EMSA erbracht. Als Negativ-Kontrolle (c) diente das aufgereinigte Amplifikat des Gens *cac2372*. Nach der Auftrennung in 6 %igen [w/v] nativen Polyacrylamidgelen erfolgte die Visualisierung der DNA durch Ethidiumbromid-Färbung. Die jeweilige Spur 1: 5 ng DNA ohne Protein, Spur 2: 5 ng DNA mit 100 ng CcpA–Strep-tagII und Spur 3: 5 ng DNA mit 400 ng CcpA–Strep-tagII. „F“ zeigt die freie DNA-Bande und „K“ den CcpA–Strep-tagII -DNA-Komplex an.

Als Positiv-Kontrolle diente der Nachweis der Bindung von CcpA–*Strep*-tagII an die *cre*-Sequenz im Promotor von *xylB* (Abb. 3.18b). Während sich bei einer CcpA-Konzentration von 400 ng in der Kontrolle bereits ein kompletter Shift vollzog, war für den EMSA mit der *fru*-Promotorsequenz noch ungebundene DNA erkennbar. Dies deutet auf eine geringere Affinität von CcpA zu der *cre*-Sequenz des *fru*-Promoters hin. Der Abbildung 3.18c ist zu entnehmen, dass CcpA–*Strep*-tagII nicht dazu in der Lage war an die Negativ-Kontrolle (DNA-Fragment des Gens *cac2372*) zu binden.

3.5.5 Herstellung einer FruR-Defektmutante *C. acetobutylicum* Δ *fruR*

Analog zu der Herstellung von PTS-defizienten *C. acetobutylicum*-Stämmen durch homologe Rekombination (3.2) wurde auch für den Regulator FruR eine Defektmutante erstellt. Diese sollte die Grundlage für die Aufklärung der Funktion von FruR während der Fruktose-Aufnahme darstellen.

Nach erfolgreicher Konstruktion des Vektors pCons::*fruR* wie unter 3.2.1 beschrieben, wurde das Plasmid *in vivo* in *E. coli* pANII methyliert und in *C. acetobutylicum* transformiert. Anschließend erfolgte die Selektion positiver Klone sowie deren Verifikation mittels PCR und Southern Hybridisierung (3.2.3). In der nachfolgenden Abb. 3.19 ist die PCR-Analyse (a) von vier positiv selektierten Klonen zu sehen, sowie die Bestätigung eines Klons mittels Southern Blot (b).

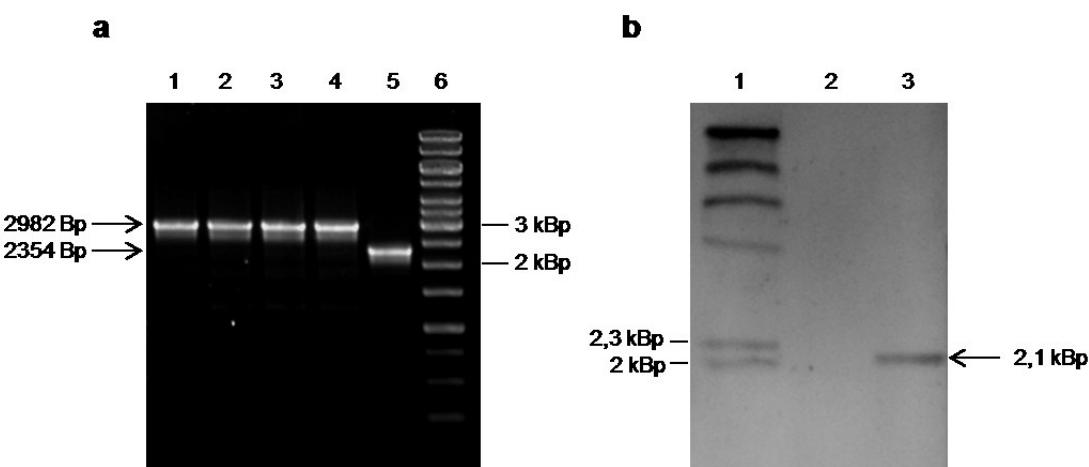


Abb. 3.19: Verifikation der Defektmutante *C. acetobutylicum* Δ *fruR*. Die Deletion von *fruR* und dessen Ersatz durch die MlsR-Kassette wurden sowohl durch eine PCR-Analyse (a) in einem 0,8 %igen Agarosegel [w/v] als auch durch den Southern Blot eines Klons (b) verifiziert. Die PCR-Analyse (a) wurde mit *fruR*-flankierenden Primern durchgeführt. Für die Southern Hybridisierung wurde eine *fruR*-spezifische Sonde genutzt. (a), Spur 1: Δ *fruR* Klon #2, Spur 2: Δ *fruR* Klon #3, Spur 3: Δ *fruR* Klon #6, Spur 4: Δ *fruR* Klon #24, Spur 5: WT, Spur 6: Längenstandard (1 kb ladder). (b), Spur 1: DIG-labeled molecular weight marker II, Spur 2: Δ *fruR* #24, Spur 3: WT.

Die PCR-Analyse wurde mit *fruR*-flankierenden Primern durchgeführt. Dabei konnte für den Wildtyp ein Amplifikat mit der Größe von 2354 Bp erzielt werden. Durch den Austausch eines 744 Bp großen Genbereiches von *fruR* gegen die Resistenzkassette *mlsR* (1372 Bp) wurde ein um 628 Bp vergrößertes Fragment mit einer Größe von 2982 Bp in vier verschiedenen Klonen (#2, #3, #6, #24) erhalten. Der abschließende Nachweis mittels Southern Hybridisierung wurde nur für den Klon #24 erbracht. Dafür wurde die zuvor isolierte genomische DNA von *C. acetobutylicum* mit dem Enzym *Xba*II restriktiert. Durch die Hybridisierung der Membran mit einer *fruR*-spezifischen Sonde war lediglich für den Wildtyp ein Fragment mit der Größe von 2100 Bp detektierbar. Durch das Fehlen einer Bande in der putativen Defektmutante $\Delta fruR$ konnte sie eindeutig verifiziert werden.

3.5.6 Plasmid-basierte Komplementation von *C. acetobutylicum* $\Delta fruR$

Wie bereits für den Deletionsstamm Δfru angewendet (3.3), wurde auch für den Stamm $\Delta fruR$ eine Plasmid-gestützte Komplementation vorgenommen. Dafür erfolgte zunächst die Klonierung des Gens *fruR* (*cac0231*) in den Vektor pThydA-catP (Abb. 3.7), wie bereits unter 3.5.4.1 beschrieben. Das rekombinante Plasmid pT $\Delta fruR$ -catP wurde anschließend *in vivo* methyliert und in den Parentalstamm *C. acetobutylicum* $\Delta fruR$ transformiert (2.9.3).

Zur Überprüfung einer tatsächlichen homologen Expression des Regulators FruR in dem Stamm *C. acetobutylicum* $\Delta fruR_compl$ wurde von drei putativ positiven Klonen das Gesamtprotein isoliert (2.11.1) und im Vergleich zum Parentalstamm $\Delta fruR$ hinsichtlich der Expression von FruR in der SDS-PAGE (2.11.4.1) und mittels Western Blot (2.11.5) untersucht. Wie der Abbildung 3.20 zu entnehmen ist, konnte die Plasmid-basierte Komplementation von $\Delta fruR$ für drei Klone bestätigt werden. Für alle drei positiven Klone konnte bereits in der SDS-PAGE eine stärkere Proteinbande auf der Höhe von etwa 27 kDa identifiziert werden. Abschließend zeigte auch der Western Blot (b) eine Bande von ca. 27 kDa, welche dem homolog exprimierten Protein FruR–Strep-tagII entspricht und im Parentalstamm nicht detektiert werden konnte.

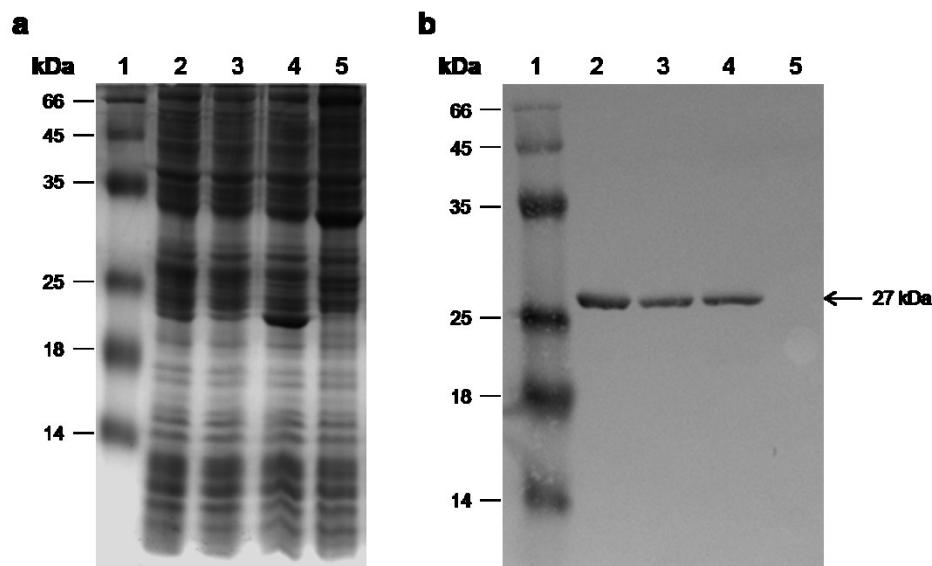


Abb. 3.20: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von *C. acetobutylicum* ΔfruR_compl. (a) Dargestellt ist das Gesamtprotein aus *C. acetobutylicum* ΔfruR (Spur 5) und drei Klonen von *C. acetobutylicum* ΔfruR_compl (Spur 2-4) mit einem Größenstandard (Prestained Molecular Weight Marker) in einem 12 %igen Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. Der dazu entsprechende Western Blot (b) zeigt für den Parentalstamm ΔfruR (Spur 5) keine detektierbare Bande und in den Komplementanten (Spur 2-4) eine Bande mit der Größe von ca. 27 kDa, welche der Größe des getagten Proteins FruR-Strep-tagII (CAC0231) entspricht.

3.5.7 Homologe Überexpression von FruR

Ein weiterer Ansatzpunkt bestand darin FruR im Wildtyp homolog zu exprimieren. Dadurch sollte Aufschluss über die regulatorische Funktion von FruR gewonnen werden. Dafür wurde der Vektor pThydA (Abb. A.3) verwendet, welcher sowohl eine Ampicillin- als auch eine Erythromycin-Resistenz vermittelt. Wie bereits ausführlich beschrieben (3.5.4.1), wurde zunächst das rekombinante Plasmid pT::fruR entsprechend der Klonierung und heterologen Expression in *E. coli* konstruiert. Einer Verifikation durch eine Kontrollrestriktion mit *Bam*H I und *Cfr*9I und durch eine positive Sequenzierung des klonierten Kontraktes, schloss sich die *in vivo* Methylierung durch eine Elektroporation des rekombinanten Plasmides pT::fruR in *E. coli* pANII an. Nach der sich anschließenden Transformation in *C. acetobutylicum* wurden zwei Klone ausgewählt, die durch Wachstum auf Erythromycin-Agarplatten selektiert wurden. Um die Expression von FruR im Wildtyp überprüfen zu können, wurde das Gesamtprotein von beiden Klonen im Vergleich zum Wildtyp aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert und im 12 %igen Polyacrylamidgel sowie Western Blot (Abb. 3.21) analysiert. Für jeden Klon (#1: Abb. 3.21 Spur 2/3; #2: Spur 6/7) und den Wildtyp (Spur 4/5) wurden jeweils 5 µg (Spur 2, 4, 6) und 10 µg (3, 5, 7) aufgetrennt. Bereits im Proteingel (Abb. 3.21a) war

eine verstärkte Proteinbande bei einer Größe von ca. 27 kDa erkennbar, welches auf die erfolgreiche homologe Expression von FruR in den beiden Klonen hindeutete. Die Überprüfung durch die Western Blot-Analyse konnte dies bestätigen (Abb. 3.21b).

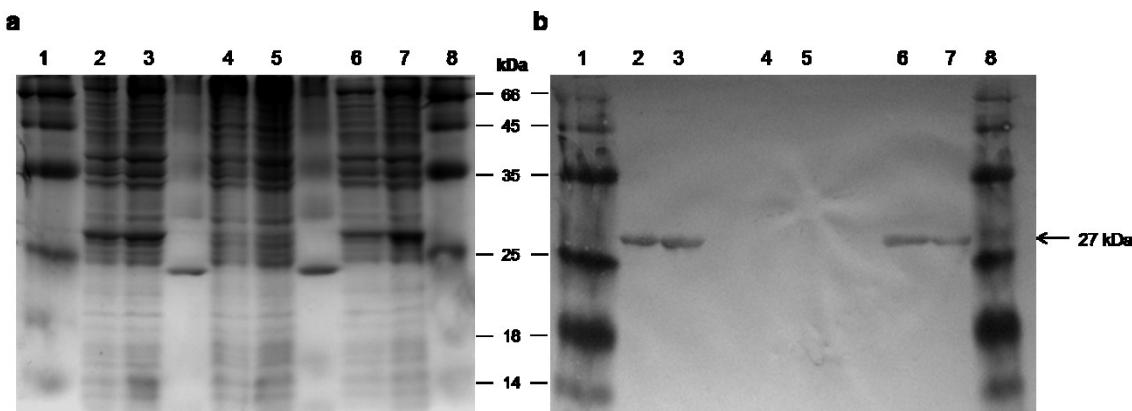


Abb. 3.21: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von *C. acetobutylicum* pT::*fruR*. (a) Dargestellt ist das Gesamtprotein aus *C. acetobutylicum* WT (Spur 4-5) und zwei Klonen von *C. acetobutylicum* pT::*fruR*. (Spur 2-3: Klon 1 und 6-7: Klon 2) mit einem Größenstandard (Prestained Molecular Weight Marker, Spur 1 und 8) in einem 12 %igen Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. Der dazu entsprechende Western Blot (b) zeigt für den WT (Spur 4-5) keine detektierbaren Banden und in den beiden *C. acetobutylicum* pT::*fruR*-Stämmen (Spur 2-3 und 6-7) eine Bande mit der Größe von ca. 27 kDa, welche der Größe des getagten Proteins FruR–Strep-tagII (CAC0231) entspricht.

3.5.8 Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* Δ *fruR* und pT::*fruR*

Im Fokus der nachfolgenden Untersuchungen stand die Aufklärung der Funktion von FruR in *C. acetobutylicum*. Als annotierter Regulator des Zuckermetabolismus und der Identifikation einer Bindestelle für FruR im Promotorbereich des *fru*-Operons erschien seine Beteiligung an der Regulation der Fruktoseaufnahme wahrscheinlich. Außerdem konnte durch die wachstumsphysiologischen Untersuchungen der drei PTS-Defektmutanten (3.4) bestätigt werden, dass das PTS^{Fru}, codiert durch das *fru*-Operon, maßgeblich für die Aufnahme und den Umsatz von Fruktose verantwortlich ist.

Anhand der wachstumsphysiologischen Charakterisierung der hergestellten *fruR*-Defektmutante Δ *fruR* (3.5.5) sowie des Überexpressionsstammes pT::*fruR* (3.5.7) wurde versucht einen Einblick in die Regulation der Fruktose-Verwertung zu erhalten. Als Kohlenstoffquelle dienten zum einen Glukose, Fruktose sowie ein Gemisch aus beiden. Das Wachstum mit Glukose als alleinigem Substrat stellte eine Wachstumskontrolle dar, da dem putativen Regulator FruR lediglich eine Fruktose-spezifische regulatorische Funktion zugesprochen wurde. Wie der Abbildung 3.22 entnommen werden kann, ließ

sich diese Annahme bestätigen. Die beiden Stämme $\Delta fruR$ und pT:: $fruR$ zeigten hinsichtlich ihres Wachstums (a), ihres Glukoseverbrauchs (c) und der finalen Fermentationsendprodukte (d) keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp.

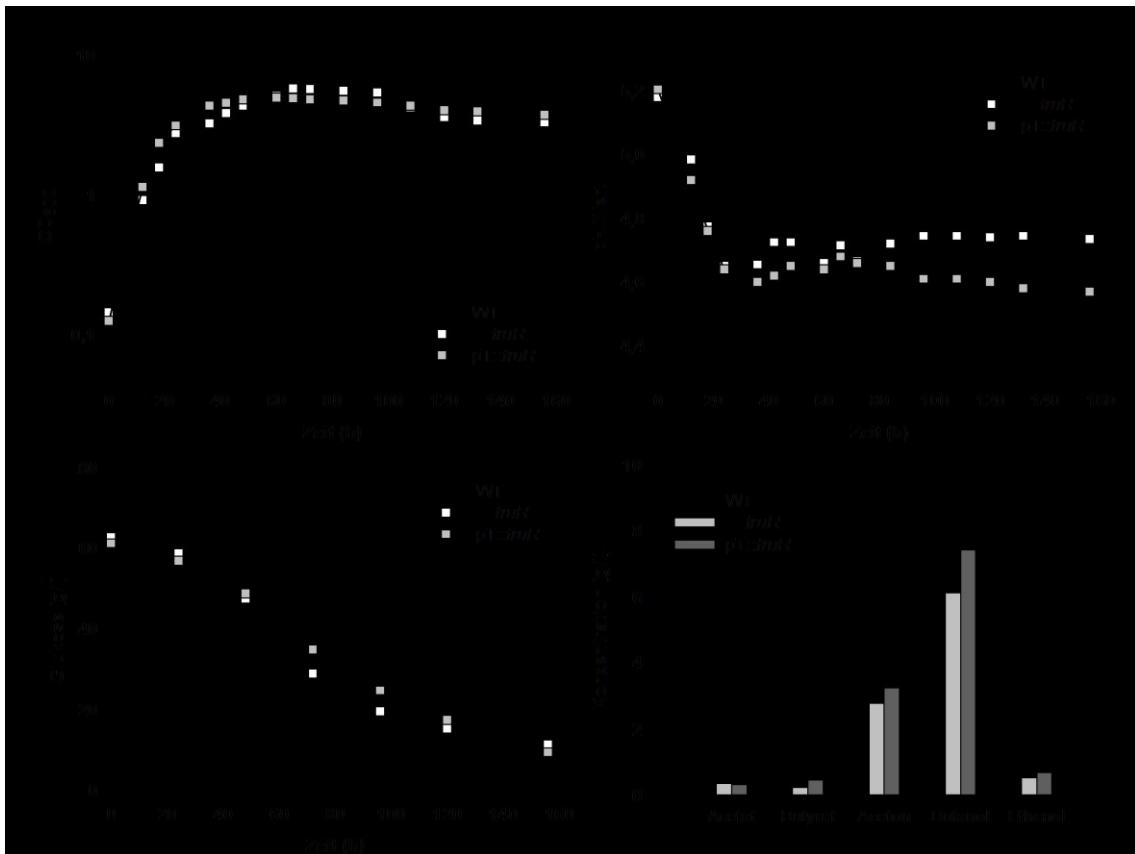


Abb. 3.22: Wachstum, Glukose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der *C. acetobutylicum* Defektmutante $\Delta fruR$ und des Überexpressionsstammes pT:: $fruR$ vergleichend zum Wildtyp. Über einen Zeitraum von 156 h bei 37 °C wurden in 200 ml MS-MES-Kulturen mit Glukose (60 g/l) als C-Quelle sowohl das Wachstum durch Messung der optischen Dichte (a) und des pH-Wertes (b) beobachtet, als auch die Konzentration der Glukose im Medium (c) enzymatisch und die Fermentationsendprodukte gaschromatographisch bestimmt. Die Mittelwerte der gebildeten Fermentationsendprodukte (d) wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 normalisiert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Replikaten ($n \geq 3$). Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Das Wachstumsverhalten beider Stämme mit Fruktose als C-Quelle hingegen offenbarte Differenzen in Bezug auf den Wildtyp (Abb. 3.23). Während der exponentiellen Wachstumsphase in den ersten 20 h wies der Deletionsstamm $\Delta fruR$ gegenüber dem Wildtyp einen vergleichbaren Anstieg der OD₆₀₀ auf (Abb. 3.23a), welches sich auch anhand der berechneten Wachstumsraten (2.6.4) von $\mu_{WT} = 0,139 \text{ h}^{-1}$ und $\mu_{\Delta fruR} = 0,133 \text{ h}^{-1}$ belegen lässt. Dennoch erreichte der Wildtyp gegenüber der Mutante $\Delta fruR$ nach ca. 140 h eine etwa doppelt so hohe OD_{Max}, während sich der Deletionsstamm bereits in einer deutli-

chen Absterbephase befand. Im Verlauf der stationären Phase nach ca. 60 h kam es in der Wildtyp-Kultur zu einem erneuten Anstieg des pH-Wertes, der in der Kultur von $\Delta fruR$ ausblieb. Dieser sank kontinuierlich ab, sodass für den Deletionsstamm der niedrigste finale pH-Wert von 4,4 gemessen werden konnte (Abb. 3.23b).



Abb. 3.23: Wachstum, Fruktose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der *C. acetobutylicum* Defektmutante $\Delta fruR$ und des Überexpressionsstammes $pT::fruR$ vergleichend zum Wildtyp. Über einen Zeitraum von 156 h bei 37 °C wurden in 200 ml MS-MES-Kulturen mit Fruktose (60 g/l) als C-Quelle sowohl das Wachstum durch Messung der optischen Dichte (a) und des pH-Wertes (b) beobachtet, als auch die Konzentration der Fruktose im Medium (c) enzymatisch und die Fermentationsendprodukte gaschromatographisch bestimmt. Die Mittelwerte der gebildeten Fermentationsendprodukte (d) wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 normalisiert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Replikaten ($n \geq 3$). Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz α wurde mit dem Student t -Test (ungepaart) berechnet und wurde als p -Wert angegeben: * $p < 0.05$ (geringfügig signifikant), ** $p < 0.01$ (sehr signifikant), *** $p < 0.001$ (hoch signifikant).

Der Stamm $\Delta fruR$ wies in der Fruktose-Aufnahme ein deutliches Defizit auf. So verbrauchte der Wildtyp mit 50 g/l eine dreifach höhere Menge als die Mutante mit ca. 15 g/l (Abb. 3.23c). Dementsprechend wurden auch nur geringere Mengen an Lösungsmitteln detektiert, sowie signifikant erhöhte Mengen an Acetat und Butyrat (Abb. 3.23d). Die Komplementante $\Delta fruR_compl$ konnte diesen Phänotyp nur partiell

wieder rückgängig machen. Während die OD₆₀₀ etwa der des Parentalstammes entsprach, ließ sich lediglich ein geringfügig gesteigerter Fruktose-Verbrauch sowie eine leicht erhöhte Lösungsmittelproduktion nachweisen. Demgegenüber führte die homologe Expression von FruR im Wildtyp (*pT::fruR*) zu einem deutlich gesteigerten exponentiellen Wachstum einhergehend mit einem 68 %igen Anstieg der Wachstumsrate auf einen Wert von $\mu_{pT::fruR} = 0,234 \text{ h}^{-1}$. Mit einem gesteigerten Zellwachstum konnten ebenso ein schnelleres Absinken des pH-Wertes (Abb. 3.23b) als auch ein leicht gesteigerter Fruktose-Verbrauch (Abb. 3.23c) in den ersten 60 h des Wachstums detektiert werden. Mit dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase ab ca. 50 h war das Wachstum des Stammes *pT::fruR* und des Wildtyps vergleichbar. Während für den Wildtyp ab ca. 100 h noch einmal ein deutlicher Anstieg in der OD₆₀₀ sowie eine Zunahme in der Rate der Fruktose-Aufnahme zu verzeichnen war, so konnte für den Überexpressionsstamm kein erneuter Anstieg in der optischen Dichte und auch nur ein gemäßigter Verbrauch der Fruktose festgestellt werden. Das Betrachten der Fermentationsendprodukte ließ erkennen, dass für den Stamm *pT::fruR* eine erhöhte Säureproduktion mit einer leicht signifikant erhöhten Acetatkonzentration und eine geringfügig verminderte Lösungsmittelproduktion gemessen werden konnte (Abb. 3.23d).

Nachfolgend wurde das Wachstumsverhalten der Stämme *ΔfruR* und *pT::fruR* im Vergleich zum Wildtyp unter Zugabe von einem Gemisch aus Glukose (10 g/l) und Fruktose (40 g/l) durchgeführt (Abb. 3.24). Zum einen konnte überprüft werden, ob eine der beiden C-Quellen bevorzugt aufgenommen wird und zum anderen ob das Fehlen von FruR bzw. dessen Überexpression Unterschiede im Wachstum erkennen lassen.

Anhand der Wachstumskurve des Wildtyps (Abb. 3.24a) lässt sich eine sequentielle Aufnahme von Glukose und Fruktose vermuten. Nach 24 h wird in der optischen Dichte ein Peak im Wachstum erreicht. Anschließend kommt es zu einem leichten Abfall der optischen Dichte, die dann nach 36 h wieder ansteigt. Ein ähnliches Verhalten konnte auch für den Überexpressionsstamm *pT::fruR* beobachtet werden. Lediglich für das Wachstum der Defektmutante *ΔfruR* konnte dies nicht dokumentiert werden. Nach dem Erreichen des Maximums nach 24 h konnte eine deutliche Abnahme der OD₆₀₀ verzeichnet werden.

Für *pT::fruR* und den Wildtyp hingegen konnte für den Verbrauch von Glukose und Fruktose eine simultane Aufnahme beobachtet werden (Abb. 3.24c). Nach 36-48 h war die dem Medium zugesetzte Glukose (10 g/l) aufgebraucht. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte auch eine ähnliche Menge an Fruktose aufgenommen werden. Dennoch zeigte

sich, dass der Stamm pT::*fruR* zu einer etwas schnelleren simultanen Fruktose-Aufnahme in der Lage war. Nur die Deletion von *fruR* führte zu einem deutlich reduzierten Verbrauch von Fruktose wie bereits im Wachstum ausschließlich mit Fruktose als C-Quelle beobachtet werden konnte. Ein Vergleich der Fermentationsendprodukte (Abb. 3.24d) lieferte keine signifikanten Unterschiede von Δ *fruR* und pT::*fruR* zum Wildtyp.



Abb. 3.24: Wachstum, Glukose- und Fruktose-Verbrauch und Fermentationsendprodukte der *C. acetobutylicum* Defektmutante Δ *fruR* und des Überexpressionsstammes pT::*fruR* vergleichend zum Wildtyp. Über einen Zeitraum von 156 h bei 37 °C wurden in 200 ml MS-MES-Kulturen mit Glukose (10 g/l) und Fruktose (40 g/l) als C-Quelle sowohl das Wachstum durch Messung der optischen Dichte (a) und des pH-Wertes (b) beobachtet, als auch die Konzentration der Glukose und Fruktose im Medium (c) enzymatisch und die Fermentationsendprodukte gaschromatographisch bestimmt. Die Mittelwerte der gebildeten Fermentationsendprodukte (d) wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 normalisiert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei Replikaten (n=3). Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

3.5.9 Bestimmung der Phosphofruktokinase-Aktivitäten

Neben der wachstumsphysiologischen Charakterisierung der hergestellten Defektmutanten Δfru , $manI::int$, $\Delta manII$ und $\Delta fruR$ sowie des Überexpressionsstammes pT::*fruR* erfolgte die Bestimmung der Phosphofruktokinase-(PFK)-Aktivitäten (2.11.7) aller Stämme im Vergleich zum Wildtyp. Dabei wurden die Stämme sowohl in Glukose- als auch Fruktose-haltigem Medium kultiviert. Die Messungen wurden unter aeroben Bedingungen mit dem isolierten Gesamtprotein (zellfreies Rohextrakt) von exponentiell gewachsenen Zellen nach Hugo und Gottschalk (1974) durchgeführt.

Tab. 3.1: Spezifische Aktivität der 1-Phosphofruktokinase und der 6-Phosphofruktokinase von verschiedenen *C. acetobutylicum*-Stämmen. Die Zellernte erfolgte nach der Kultivierung in MS-MES mit entweder Glukose (Glu), Fruktose (Fru) oder Glukose und Fruktose (Glu+Fru) in der exponentiellen Phase. Die spezifische Aktivität (U/g) wurde spektrophotometrisch in zellfreiem Extrakt gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

<i>C. acetobutylicum</i>	Spezifische Aktivität					
	1-Phosphofruktokinase (U/g Protein)			6-Phosphofruktokinase (U/g Protein)		
	Glu	Fru	Glu+Fru	Glu	Fru	Glu+Fru
WT	-	633	164	2749	1206	2489
Δfru	-	-	-	2325	1830	1609
$\Delta fruR$	-	284	25	2646	2000	2295
pT::fruR	-	572	122	2820	1272	3293
$manI::int$	-	624	n. d.	3084	1373	n. d.
$\Delta manII$	-	795	n. d.	3381	1659	n. d.

(-), keine messbare Aktivität; (n. d.), nicht definiert

Anhand des 1-PFK-Assays konnte die Vermutung bestätigt werden, dass das zweite Gen des *fru*-Operons *cac0232* (*fruB*) für die einzige 1-PFK im Genom von *C. acetobutylicum* (Nölling *et al.*, 2001) codiert. Nach der Deletion des *fru*-Operons (Δfru) war unter keinen Umständen eine 1-PFK-Aktivität mehr nachweisbar. Somit konnte auch auf biochemischer Ebene der Beweis erbracht werden, dass die Deletion des *fru*-Operons zu dessen funktionellen Verlust führte.

Generell konnte für das Wachstum aller getesteten Stämme keine 1-PFK-Aktivität detektiert werden, wenn diese ausschließlich mit Glukose als C-Quelle kultiviert wurden. Dies unterstützt zudem die Hypothese, dass das *fru*-Operon Substrat-spezifisch indu-

ziert wird. Des Weiteren führte der funktionelle Verlust des Regulators FruR in der Mutante $\Delta fruR$ zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität der 1-PFK.

Ein Schlüsselenzym der Glykolyse stellt die 6-PFK (PfkA, CAC0517) dar. Sie katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Glykolyse und wandelt Fruktose-6-Phosphat in Fruktose-1,6-Bisphosphat um. Sie wird sowohl für das Wachstum mit Glukose als auch Fruktose benötigt. Im Allgemeinen konnte festgestellt werden, dass die Aktivität der 6-PFK deutlich höher war als die der 1-PFK. Wenn Glukose alleiniges Substrat war, so konnte für alle untersuchten Stämme eine 6-PFK-Aktivität von 2300 bis 3400 U/g Protein gemessen werden. Daher wiesen alle Stämme eine vergleichbar hohe Aktivität auf. Auch in Fruktose-Medium konnten hohe spezifische Aktivitäten der 6-PFK ermittelt werden, die sogar mindestens doppelt so hoch waren, wie die jeweils dazugehörigen 1-PFK-Aktivitäten. Dennoch waren die 6-PFK-Aktivitäten im Fruktose-Medium nur etwa halb so hoch wie unter Glukose-Bedingungen. Lediglich in den Deletionsstämmen Δfru und $\Delta fruR$ ließen sich unter Wachstum auf Fruktose vergleichsweise erhöhte 6-PFK-Aktivitäten bestimmen.

Abschließend wurden die beiden Phosphofructokinase-Aktivitäten der drei Stämme Δfru , $\Delta fruR$ und pT::*fruR* im Vergleich zum Wildtyp in Medium untersucht, welches ein Gemisch aus Glukose und Fruktose enthielt. Für die Aktivität der 6-PFK konnten dabei vergleichbare Werte wie unter reinem Glukose-Wachstum erzielt werden. Die Aktivität der 1-PFK für alle analysierten Stämme hingegen war gegenüber denjenigen im Fruktose-Medium deutlich reduziert. Der Stamm pT::*fruR* sowie der Wildtyp wiesen eine 4-fache Abnahme der spezifischen Aktivität der 1-PFK auf, während für $\Delta fruR$ sogar ein 11-fach verminderter Wert ermittelt werden konnte.

4. Diskussion

Mit der Entdeckung des ersten bakteriellen Phosphotransferase Systems (PTS) in *E. coli* vor fast 50 Jahren (Kundig *et al.*, 1964) wurde die Grundlage für das Verständnis der Aufnahme von Kohlenhydraten geschaffen. Seitdem konnte eine Vielzahl von verschiedenen PTS für die Aufnahme von Mono- und Disacchariden sowie Zuckeralkoholen in vielen anderen Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien identifiziert werden (Saier und Reizer, 1994; Deutscher *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1993; Kotrba *et al.*, 2001). Neben ihrer primären Funktion in der Zuckeraufnahme, dem -transport und der -phosphorylierung konnte ihnen auch eine maßgebliche Bedeutung an der Regulation des Kohlenhydrat-Metabolismus zugeschrieben werden (Saier, 2001; Stülke und Hillen, 1998).

Auch für *C. acetobutylicum* konnten innerhalb der letzten Jahrzehnte dreizehn PTS identifiziert und klassifiziert werden, die für die Aufnahme von verschiedenen Zuckern und ihren Derivaten verantwortlich sind (Nölling *et al.*, 2001; Mitchell, 1998; Mitchell und Tangney, 2005). Trotz großer Fortschritte in der Aufklärung des Aufnahme- und Regulationsmechanismus einiger Kohlenhydrate, wie z. B. Glukose (Tangney und Mitchell, 2007), Laktose (Yu *et al.*, 2007) und Sukrose (Tangney und Mitchell, 2000), ist der Metabolismus von *C. acetobutylicum* längst noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Insbesondere über den Metabolismus von Fruktose in *C. acetobutylicum* ist bisher nur wenig bekannt, obwohl es bereits in den 70er Jahren als schnell zu metabolisierendes Substrat für eine Vielzahl von Clostridien galt (Hugo und Gottschalk, 1974). So wurde Fruktose auch für *C. acetobutylicum* bereits durch Hutkins und Kashket (1986) als C-Quelle verwendet mit der Kenntnis darüber, dass es neben Glukose als bevorzugtes Substrat für das Wachstum gilt. Mit der Sequenzierung des Genoms von *C. acetobutylicum* (Nölling *et al.*, 2001) und auf Sequenzhomologien basierenden Genomvergleichen, konnten drei PTS (PTS^{Fru} , PTS^{ManI} und $\text{PTS}^{\text{ManII}}$) identifiziert werden, die für die Fruktose-Aufnahme mutmaßlich verantwortlich sind (Mitchell und Tangney, 2005). Zudem wurde in einer Transkriptionsstudie von Servinsky *et al.* (2010) das Wachstum von *C. acetobutylicum* mit elf unterschiedlichen C-Quellen analysiert. Dabei konnten zwei dieser drei PTS (PTS^{Fru} und $\text{PTS}^{\text{ManII}}$) mit der Fruktose-Aufnahme in Verbindung gebracht werden. In Bezug auf die Fruktose-Aufnahme blieb allerdings bislang unklar, welches System hauptsächlich für dessen Transport in die Zelle verantwortlich ist. Des Weiteren konnte bisher auch keine Aussage über die Regulation der Fruktose-

Aufnahme getroffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nunmehr herausgestellt werden inwieweit eine Beteiligung der drei identifizierten PTS an der Fruktoseaufnahme auf physiologischer Ebene bestätigt werden konnte. Ein weiterer Fokus bestand auch in der Untersuchung der Regulation der Fruktose-Aufnahme. Da Fruktose neben Glukose und Mannose zu den bevorzugten C-Quellen von *C. acetobutylicum* zählt, war fraglich, ob dessen Metabolismus überhaupt einer gesonderten Regulation unterliegt.

4.1 Die Aufnahme von Fruktose in *C. acetobutylicum*

Alle Phosphotransferase Systeme teilen sich ein Enzym I und ein HPr-Protein und unterscheiden sich lediglich in ihrer Enzym II-Permease. Aufgrund der Unterschiede im Enzym II erfolgte die Einteilung der PTS in sieben Familien (Barabote und Saier, 2005). Anhand von Sequenzvergleichen und der Zuordnung zu einer dieser PTS-Familien kann bereits eine Aussage über potentielle Substrate einer PTS-Permease getroffen werden. Mit der Aufnahme von Fruktose konnten bisher zwei dieser Familien von PTS Permeasen, die Fruktose-Mannitol-(Fru)-Familie sowie die Mannose-Fruktose-Sorbose-(Man)-Familie, in diversen Organismen wie z. B. *E. coli* (Kornberg, 2001), *L. lactis* (Benthin *et al.*, 1993) und *Aeromonas hydrophila* (Binet *et al.*, 1998) in Verbindung gebracht werden. In *C. acetobutylicum* konnten sowohl zwei Permeasen der Fru-Familie (PTS^{Mtl} und PTS^{Fru}) als auch zwei Permeasen der Man-Familie (PTS^{ManI} und $\text{PTS}^{\text{ManII}}$) identifiziert werden (Mitchell and Tangney, 2005).

Zu den Mitgliedern der Fru-Familie zählen eine Permease für die Aufnahme von Mannitol (CAC0154/0156; Behrens *et al.*, 2001) und eine vermeintliche Fruktose-Permease, welche vom *fru*-Operon codiert wird. Neben den Genen für die EII-Permease (*fruC*, *cac0233* und *fruD*, *cac0234*) befinden sich zusätzlich die Gene für einen mutmaßlichen Transkriptionsregulator des Zuckerkatabolismus (*fruR*, *cac0231*) und eine 1-Phosphofruktokinase (*fruB*, *cac0232*) in diesem Operon.

Die Permeasen der Man-Familie zeichnen sich durch eine vierte Proteindomäne (EIID) aus. Im Allgemeinen sind Permeasen dieser Familie für ihr breites Substratspektrum bekannt und können dazu in der Lage sein Mannose, Fruktose, Sorbose, Glukosamin oder aber auch Galaktosamin aufzunehmen (Kotrba *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2010). So wurde für das PTS^{Man} aus *E. coli* der Transport von Glukose, Mannose, Fruktose, Glukosamin, N-Acetylglukosamin und N-Acetylmannosamin nachgewiesen (Plumbbridge und Vimr, 1999). Für die beiden Man-PTS aus *C. acetobutylicum* konnte jedoch

bisher kein spezifisches oder bevorzugtes Substrat identifiziert werden (Mitchell and Tangney, 2005). Während die Gene für das PTS^{ManI} auf dem Chromosom lokalisiert sind, befindet sich das PTS^{ManII} auf dem Megaplasmid pSOL1. Im Gegensatz zum *fru*-Operon werden durch die Operone *manI* (*cac1457-1461*) und *manII* (*cap0066-cap0068*) ausschließlich Untereinheiten der jeweiligen EII-Permease codiert.

In den Transkriptionsanalysen von Servinsky *et al.* (2010) zeigte sich für *C. acetobutylicum*, dass sich nur eine geringe Anzahl von Genen hinsichtlich ihrer Transkriptlevel unterschieden, wenn Fruktose oder Glukose als einzige C-Quelle genutzt wurde. So waren lediglich 17 Gene durch Fruktose induziert, wozu alle vier Gene des *fru*-Operons als auch diejenigen des *manII*-Operon zählten. Die Gene des *manI*-Operons hingegen waren unter keiner der getesteten C-Quellen differentiell exprimiert. Demgegenüber konnte in selbständig durchgeföhrten Microarray-Experimenten zur Analyse des acidogenen Transkriptes des Wildtyps, während des Wachstums auf Fruktose gegenüber Glukose-Bedingungen in kontinuierlicher Kultur, neben einer Induktion des *fru*- und des *manII*-Operons auch eine verstärkte Transkription des *manI*-Operons nachgewiesen werden. Somit ist die Beteiligung des PTS^{Fru}, des PTS^{ManI} und des PTS^{ManII} an dem Transport von Fruktose sehr wahrscheinlich.

Die genauere Betrachtung der Organisation der drei Operone offenbarte zudem, dass das *fru*-Operon für die einzige im Genom von *C. acetobutylicum* annotierte 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) codiert. Im Allgemeinen wird dieses Enzym für eine effiziente Fruktose-Verwertung als notwendig erachtet (Ferenci und Kornberg, 1971b). Während der Aufnahme der Fruktose über das PTS^{Fru} wird sie zeitgleich zu Fruktose-1-Phosphat (F-1-P) umgesetzt, welches dann anschließend durch die 1-PFK zu Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP) umgewandelt wird. Der Umsatz von FBP des Fruktose-Abbaus erfolgt dann durch die Glykolyse analog zur Glukoseverwertung.

Im Falle der Fruktose-Aufnahme durch die beiden Man-PTS wird die Fruktose unmittelbar zu Fruktose-6-Phosphat (F-6-P) phosphoryliert (Kotrba *et al.*, 2001), einem Intermediat der Glykolyse. Demnach wird für die Aufnahme von Fruktose über die Man-PTS kein zusätzliches Enzym benötigt. Das Vorliegen einer Phosphofruktokinase im *fru*-Operon für die spezifische intrazelluläre Verwertung von F-1-P ließ die Vermutung zu, dass das PTS^{Fru} das hauptsächliche Transportsystem für Fruktose ist. Die beiden Aufnahmewege von Fruktose sind in der nachfolgenden Abbildung 4.1 dargestellt.

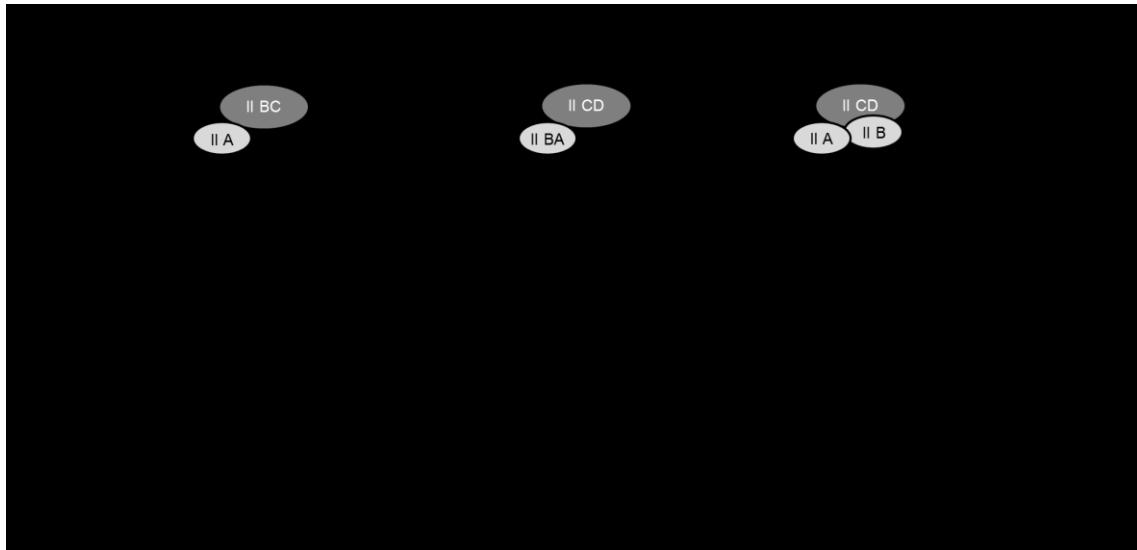


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der beiden putativen Fruktose-Aufnahmewege in *C. acetobutylicum*. Der Aufbau der drei PTS-Transporter wird durch die grauen Ovale symbolisiert, die anhand der PTS-Untereinheiten Nomenklatur und ihrer entsprechenden ORF-Nummerierung dargestellt sind. Links befindet sich das PTS^{Fru} (CAC0233/0234), welches als putatives Hauptaufnahmesystem (dicker Pfeil) die aufgenommene Fruktose zu F-1-P und dann zu FBP mittels der vom eigenen Operon koordinierten 1-PFK (FruB) umsetzt, bevor dieses über die Glykolyse weiter metabolisiert wird. In der Mitte befinden sich das PTS^{ManII} (CAP0066-CAP0068) und rechts das PTS^{ManI} (CAC1457-CAC1460). Die über diese Man-PTS aufgenommene Fruktose wird während dessen zu F-6-P umgesetzt, welches bereits ein Intermediat der Glykolyse darstellt. Demnach tritt die so aufgenommene Fruktose einen Schritt früher in die Glykolyse ein. Abkürzungen: PEP, Phosphoenolpyruvat; F-1-P, Fruktose-1-Phosphat; F-6-P, Fruktose-6-Phosphat; Pfk, Phosphofructokinase; FBP, Fruktose-1,6-bisphosphat.

4.1.1 Konstruktion von PTS-defizienten *C. acetobutylicum*-Stämmen

Um Anhaltspunkte über ihre Beteiligung an der Fruktose-Aufnahme zu erhalten, wurden die drei Transportsysteme PTS^{Fru}, PTS^{ManI} und PTS^{ManII} zunächst durch Mutagenese funktionell inaktiviert. Dies geschah zum einen durch die Deletion der vollständigen Operone *fru* und *manII* mittels Homologer Rekombination (Soucaille *et al.*, 2006), wobei diese jeweils durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurden. Andererseits erfolgte mit Hilfe des etablierten ClosTron®-Systems (Heap *et al.*, 2007; Cooksley *et al.*, 2012; Lehmann, 2012) die Insertion eines spezifisch angepassten Gruppe II Introns mit einer Erythromycin-Resistenzkassette in das erste Gen (*cac1457*) des *manI*-Operons.

Beide angewandten Systeme dienen der zielgerichteten Inaktivierung. Dabei weisen beide Formen sowohl Vorteile als auch Nachteile in ihrer Anwendung auf. So ermöglicht das ClosTron®-System gegenüber der Homologen Rekombination eine schnellere Erzeugung von Mutanten, da das Screening-Verfahren weniger aufwändig ist. Demgegenüber können jedoch polare Effekte durch die Insertion des Gruppe II Introns auftreten.

ten, sodass stromabwärts gelegene Gene in ihrer Funktion gestört werden können (Heap *et al.*, 2009). Für die Methode der Homologen Rekombination sind solche Effekte bisher nicht beschrieben worden, welches diese Methode vorteilhaft erscheinen lässt.

Nach der Herstellung der Defektmutanten Δfru , $manI::int$ und $\Delta manII$ erfolgte ihre wachstumsphysiologische Charakterisierung. Dazu wurden statische Kulturen der drei erzeugten Mutanten vergleichend zum Wildtyp in Mineralmedium mit drei verschiedenen C-Quellen untersucht. So wurde das Wachstum in Glukose-, Fruktose- und Mannose-haltigem Medium analysiert, mit dem Hauptaugenmerk auf dem Wachstum mit Fruktose. Die Verwendung von Glukose diente als Kontrolle, da Glukose zu den bevorzugten Substraten von *C. acetobutylicum* zählt (Tangney *et al.*, 2003). Darüber hinaus ließ sich durch dieses Vorgehen neben einem Vergleich des Wachstums der einzelnen Stämme auch ein direkter Vergleich der jeweiligen Substratumssetzung realisieren.

4.1.2 Die Bedeutung des PTS^{Fru} für die Fruktose-Aufnahme von *C. acetobutylicum*

Basierend auf den dieser Arbeit zugrunde liegenden Transkriptionsdaten und Sequenzvergleichen bestand die Hypothese, dass das PTS^{Fru} das primäre Aufnahme- und Transportsystem für das Substrat Fruktose in *C. acetobutylicum* darstellt. Dieses PTS wird zusammen mit einem putativen Transkriptionsregulator und einer 1-PFK von dem *fru*-Operon codiert. Die Erzeugung der Defektmutante Δfru , in der das gesamte *fru*-Operon deletiert und durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde, ermöglichte indirekt die Aufklärung der Funktion des PTS^{Fru} für die Fruktose-Aufnahme. Durch die vergleichende Analyse des Wachstums der Mutante Δfru und des Wildtyps auf Fruktose konnte zweifelsfrei bestätigt werden, dass das PTS^{Fru} hauptsächlich für den Transport und Metabolismus von Fruktose verantwortlich ist. So führte die Ausschaltung dieses Transporters zu einer drastischen Reduzierung der Wachstumsrate und der Fruktose-Aufnahme. Dennoch führte die Deletion des *fru*-Operons zu keinem Fruktosenegativen Phänotyp. Alternative Aufnahmesysteme für Fruktose sind durchaus bekannt, wie z. B. für eine PTS^{Fru}-negative Mutante aus *Streptococcus mutans* (Gauthier *et al.*, 1984). Die Konsequenz, die daraus geschlussfolgert werden kann ist, dass noch mindestens ein weiteres Aufnahmesystem für Fruktose in *C. acetobutylicum* existieren muss. Für *E. coli* konnten drei Routen beschrieben werden, über die Fruktose in die Zelle gelangt. Über die Route A wird die Fruktose mittels eines PTS^{Fru} aufgenommen und zu F-1-P umgesetzt. Dieser Weg wird als Hauptroute bezeichnet, da bei sehr geringen Fruktose-Konzentrationen (< 2 mM) das Substrat lediglich über diesen Weg aufge-

nommen werden kann. Die Route B wird ebenfalls als eine PTS-gekoppelte Aufnahme beschrieben, wobei die Fruktose über PTS^{Man}-Permeasen aufgenommen wird, die die 3,4,5-D-Arabino-Hexose-Konfiguration von Substraten erkennen und Fruktose zu F-6-P phosphorylieren. Die Fruktoseaufnahme über die dritte Route C findet durch die erleichterte Diffusion statt, wobei keine PTS involviert sind (Kornberg, 2001). Diese Form des Transportes ist jedoch vernachlässigbar, da nur sehr geringen Mengen aufgenommen werden können (Kornberg *et al.*, 2000).

Allgemein scheint eine optimale Aufnahme von Fruktose nicht nur von dem Vorhandensein eines funktionalen PTS^{Fru} abhängig zu sein, sondern auch von der Enzymaktivität der 1-PFK. Für einige Clostridien-Arten wie *C. thermocellum* und *C. pasteurianum* konnte bisher nachgewiesen werden, dass sie dieses Enzym besitzen und es in Anwesenheit von Fruktose im Medium induziert vorliegt (Patni und Alexander, 1971; Hugo und Gottschalk, 1974). Darüber hinaus wurde für die Mehrzahl dieser Stämme unter Fruktose-Wachstum eine 2- bis 4-fach höhere 1-PFK-Aktivität detektiert im Vergleich zur 6-PFK-Aktivität. Für *Clostridium formicoaceticum*, *Streptococcus mutans* sowie *Streptococcus salivarius* konnte hingegen Gegenteiliges beobachtet werden. So war in diesen Stämmen die Aktivität der 6-PFK doppelt so hoch wie die der 1-PFK (Hugo und Gottschalk, 1974; Gauthier *et al.*, 1984; Bourassa und Vadeboncoeur, 1992). Auch für den Wildtyp von *C. acetobutylicum* war eine doppelt so hohe 6-PFK-Aktivität unter Fruktose-Bedingungen messbar. Darüber hinaus ließ sich durch die Messung der 1-PFK-Aktivität bestätigen, dass es sich bei dem Enzym FruB (CAC0232) um die tatsächlich einzige 1-PFK im Genom von *C. acetobutylicum* handelt, denn die Deletion des *fru*-Operons führte zu einem kompletten Aktivitätsverlust des Enzyms. In Zellen, die mit Glukose kultiviert wurden, war ebenso keine spezifische Aktivität der 1-PFK messbar. Daraus konnte gefolgert werden, dass die Induktion des PTS^{Fru} und der 1-PFK an das Vorhandensein von Fruktose im Medium gekoppelt ist.

Darüber hinaus bewirkte die Deletion des *fru*-Operons ein Absinken des Fruktose-Verbrauchs auf nur noch 10 % im Vergleich zum Wildtyp. Falls die verbliebene Fruktose-Aufnahme eine Nebenaktivität der Man-PTS darstellt, ist davon auszugehen, dass die Aktivitäten dieser Systeme im Hinblick auf den Fruktose-Transport nicht regulierbar sind. Die Umsetzung des F-6-P in der Zelle durch die 6-PFK erfolgt nur ungenügend und kann den Verlust der 1-PFK nicht kompensieren, wie es bereits für *E. coli* gezeigt werden konnte (Ferenci und Kornberg, 1971a).

Einhergehend mit dem Wachstumsdefizit der Mutante Δfru auf Fruktose, zeigte sich auch ein fast gänzlicher Verlust der Fähigkeit Lösungsmittel zu bilden. So konnte die Mutante unter den gewählten Wachstumsbedingungen kein Butanol produzieren und nur minimale Konzentrationen an Aceton und Ethanol waren detektierbar. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in einem zu geringen Fruktose-Umsatz begründet. Diese Vermutung bestätigen zusätzlich durchgeführte Wachstumsversuche mit variierenden Fruktose- bzw. Glukosekonzentrationen (0,5 %; 1 %; 2,5 %; 5 %). Es zeigte sich, dass für *C. acetobutylicum* erst ab einer Konzentration von 1 % (10 g/l) C-Quelle im Medium die Lösungsmittelbildung einsetzte (Abb. A.5). Die Limitierung der Menge an C-Quelle führte auch bei Monot *et al.* (1982) und Fond *et al.* (1984) zu einer ausschließlichen Säure-Fermentation. Die geringe Zuckerkonzentration ließ nur ein Wachstum während der exponentiellen Phase zu, wodurch lediglich Acetat und Butyrat gebildet wurden, welches eine höhere Energieausbeute (ATP) liefert (Jones und Woods, 1986). Das primäre Ziel der Aufnahme von Kohlenhydraten liegt in der Generierung von Energie in Form von ATP und durch die Produktion von Säuren kann mehr ATP gebildet werden, als durch die Bildung von Lösungsmitteln. Das bedeutet, dass bei *C. acetobutylicum* eine limitierte Versorgung mit C-Quelle mit einer Unterversorgung an ATP einhergeht (Meyer und Papoutsakis, 1989). Im Hinblick auf die Mutante Δfru bedeutet dies, dass ihre eingeschränkte Aufnahme von Fruktose zu einem niedrigeren Level an ATP führte. Die gesamte Menge an gebildetem ATP wurde in dem Stamm Δfru für den grundlegenden Stoffwechsel im Zuge der Zellteilung verbraucht. Durch die fortwährende Säureproduktion sankt der pH-Wert stetig ab, welches generell die Umstellung des Metabolismus zur Lösungsmittelproduktion auslöst. Die benötigte Energie, die für diesen Prozess bereitgestellt werden muss, war vermutlich in der Mutante Δfru nicht vorhanden, sodass die Lösungsmittelbildung nicht einsetzen konnte.

Des Weiteren erwies sich die gebildete Menge an Säureendprodukten unter C-Quellen-Limitierung als ungenügend, um die Lösungsmittelbildung zu initiieren (Monot *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1986; Meyer und Papoutsakis, 1989). Hinzu kommt, dass die gebildeten Säuren in das Medium abgegeben werden, was zu einer Absenkung des externen pH-Wertes führt. Wenn der externe pH einen kritischen Punkt (etwa pH 4,5) erreicht hat, dann liegen die Säuren in hohen Mengen in ihrer undissoziierten Form vor (Häggström, 1985). Undissoziierte Säuren sind ab einer bestimmten Konzentration toxisch für die Zellen, da sie frei über die Cytoplasmamembran diffundieren können (Kell *et al.*, 1981) und intrazellulär erneut dissoziieren. Dies führt zu einem Zusammenbruch des

pH-Gradienten an der Zellmembran, welches folglich in einer totalen Inhibierung aller metabolischen Funktionen in der Zelle resultiert (Herrero, 1983). Daher ist die Initiation des Shiftes zur Lösungsmittelbildung nicht nur von einer ausreichenden Verwertung der C-Quelle abhängig, sondern auch von dem externen pH-Wert und einer entsprechenden Konzentration an Säuren, dabei vor allem Butyrat. So konnten Terracciano und Kashket (1986) zeigen, dass erst ab einer intrazellulären Konzentration von 13 mM undissoziiertem Butyrat bzw. einer extrazellulären Konzentration von 25-28 mM (2,2-2,4 g/l) die Bildung von Butanol einsetzt. Die Betrachtung der Verläufe der Butyrat-Bildung während des Wachstums auf Fruktose (Abb. A.6) von dem Wildtyp und dem Stamm Δfru zeigt deutlich, dass für den Wildtyp nach etwa 50 h eine Butyrat-Konzentration von 25 mM erreicht wurde und parallel dazu die Synthese von Butanol beginnt. Der Stamm Δfru zeigte eine deutlich langsamere Synthese von Butyrat und konnte eine solche Menge erst nach ca. 90 h erreichen. Zu diesem Zeitpunkt konnte aber bereits ein niedrigerer externer pH-Wert als 4,5 gemessen werden. Somit war die Mutante zwar dazu in der Lage die nötige Schwellenkonzentration an Butyrat zu erreichen, allerdings erst als der pH-Wert bereits so stark abgesunken war, dass es wahrscheinlich schon zum metabolischen Stillstand in den Zellen kam. Die Tatsache, dass ab ca. 90 h auch kein weiterer Konsum von Fruktose zu verzeichnen war, während die Aufnahme im Wildtyp noch andauerte, unterstützt diese Theorie.

Die Plasmid-gestützte Komplementation von Δfru führte zur Initiierung der Lösungsmittelbildung, wodurch bestätigt werden konnte, dass die phänotypischen Veränderungen in der Defektmutante ausschließlich auf den Verlust des *fru*-Operons zurückzuführen ist. Auch die Wachstumsrate des Stammes Δfru_compl erreichte das Niveau des Wildtyps, wenngleich die maximale OD der des Parentalstammes Δfru glich. Hinsichtlich ihrer Fruktose-Aufnahme waren bis zu einem Zeitpunkt von 90 h kaum Unterschiede zwischen der Komplementante und dem Wildtyp festzustellen. Bis zum Ende der statischen Kultur stagnierte dann allerdings die Aufnahme im Stamm Δfru_compl , wie es bereits für den Parentalstamm beobachtet werden konnte. Da im Stamm Δfru_compl außerdem auch signifikant höhere Säureendprodukte gemessen werden konnten, kann auch hier eine vorzeitige Einstellung der metabolischen Aktivität vermutet werden. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass die Komplementation nur partiell funktioniert hat. Im Gegensatz dazu konnte durch Wietzke und Bahl (2012) eine nahezu vollständige Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps gezeigt werden, allerdings wurde dort auch ein anderes Vektorsystem unter Verwendung des nativen Promotors genutzt. Die Ursachen für diesen Unterschied sind unklar.

chen für eine unzureichende Komplementation von Δfru liegen vermutlich in der veränderten Expression des *fru*-Operons durch Verwendung eines konstitutiven Promotors und einer erhöhten Gendosis durch die Kopienzahl des Vektors.

4.1.3 Die Rolle der Man-PTS für die Fruktose-Aufnahme von *C. acetobutylicum*

Da trotz der Deletion des PTS^{Fru} immer noch eine geringe Fruktose-Aufnahme zu verzeichnen war, muss noch mindestens ein anderes Transportsystem an der Aufnahme beteiligt sein. Bereits in anderen Bakterien, wie z. B. *E. coli* (Ferenci und Kornberg, 1971a) oder *L. lactis* (Benthin *et al.*, 1993), konnte die Existenz von mindestens zwei PTS für die Aufnahme von Fruktose nachgewiesen werden. Dort waren sowohl ein induzierbares Fru-PTS als auch ein konstitutiv exprimierte Man-PTS für den Transport von Fruktose verantwortlich.

Durch die Herstellung und Charakterisierung des Wachstums der Defektmutanten *manI::int* und $\Delta manII$ wurde versucht einen Einblick in dessen mögliche Beteiligung an der Aufnahme von Fruktose zu erhalten. Die Inaktivierung von PTS^{ManI} hatte dabei weder einen Einfluss auf das Wachstum mit Fruktose noch auf die Bildung der Fermentationsprodukte. Daher kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass das PTS^{ManI} generell Fruktose aufnehmen kann, jedoch besitzt es nachweislich keine Relevanz für die Fruktose-Verwertung solange das PTS^{Fru} vorhanden und aktiv ist. Anders hingegen verhält es sich mit dem Wachstumsverhalten der $\Delta manII$ -Mutante. Durch die Deletion des PTS^{ManII} erfolgte ein deutlich gesteigerter und frühzeitiger einsetzender Fruktose-Verbrauch einhergehend mit einer erhöhten Lösungsmittelbildung. In dem Stamm $\Delta manII$ wurde bereits 60 h früher die gleiche finale Fruktose-Konzentration erreicht wie im Wildtyp. Demnach scheint eine Korrelation zwischen dem funktionalen Ausfall des PTS^{ManII} und einer möglicherweise gesteigerten Aufnahme durch das PTS^{Fru} zu bestehen. So zeigte sich in den Aktivitätsmessungen der 1-PFK eine gesteigerte Aktivität in der Mutante $\Delta manII$. In *L. lactis* führt die Umsetzung der Fruktose zu F-1-P über das PTS^{Fru} lediglich zur Energieproduktion durch die Bildung von Laktat, während die Aufnahme über das PTS^{Man} resultierend in F-6-P sowohl zur Produktion von Biomasse als auch metabolischer Energie führte (Benthin *et al.*, 1993). Auf *C. acetobutylicum* übertragen könnte dies bedeuten, dass durch den Verlust des PTS^{ManII}-Transporters mehr Fruktose über das PTS^{Fru} aufgenommen werden kann, welches der effizientere Fruktose-Aufnahmeweg zu sein scheint (Kornberg, 2001). Folglich kann früher mehr Energie in Form von ATP gebildet werden, sodass es zu einem früheren Lösungsmittelshift und

einer gesteigerten Lösungsmittelproduktion kommen kann. Ob die Transkription des *fru*-Operons in dem Stamm $\Delta manII$ erhöht vorliegt, könnte durch Northern Blot-Analysen oder RT-PCR Experimente untersucht werden.

Ergänzend zu der Untersuchung des Wachstums auf Fruktose wurde auch eine Charakterisierung mit Mannose als Substrat vorgenommen, da das Man-PTS in Enterobakterien als einziges effektives Aufnahmesystem für Mannose beschrieben wurde (Postma *et al.*, 1993). Bisher konnte für den Mannose-Transport in *C. acetobutylicum* kein PTS eindeutig identifiziert werden, aber dennoch wird eine Beteiligung von zumindest einem der beiden existierenden Man-PTS an der Mannose-Aufnahme vermutet (Mitchell and Tangney, 2005).

Das PTS^{ManI} spielt zwar scheinbar keine maßgebliche Rolle für die Aufnahme von Fruktose, aber stattdessen hat es einen Einfluss auf die Verwertung von Mannose. So zeigte die Mutante *manI::int* besonders während des exponentiellen Wachstums auf Mannose eine deutlich verringerte Wachstumsrate. Doch nach etwa 70 h setzte ein verstärkter Verbrauch von Mannose ein, so dass dieser Stamm am Ende die meiste Mannose umgesetzt hatte und darüber hinaus signifikant höhere Mengen an Lösungsmitteln produziert hatte. Dieses Phänomen erscheint nur dadurch erklärbar, dass wohlmöglich entweder das andere PTS^{ManII}, das PTS^{Fru} oder aber auch beide besonders während der stationären Wachstumsphase für die Mannose-Aufnahme verantwortlich sind. Ein Verlust eines dieser beiden Transporter führte während des exponentiellen Wachstums zu keinen Unterschieden, wohingegen während der stationären Phase ein reduzierter Mannose-Verbrauch ermittelt werden konnte. Zusammengefasst kann also keines der drei untersuchten PTS alleine für die Aufnahme von Mannose verantwortlich sein.

4.1.4 Ausblick

Anhand der erzielten Ergebnisse kann natürlich nicht zweifelsfrei belegt werden, dass nicht auch noch andere Transportsysteme für die Aufnahme von Fruktose in Frage kommen als die hier untersuchten. Daher wären die Konstruktion von Doppelmutanten des PTS^{Fru} und jeweils eines der Man-PTS und die Herstellung einer Dreifachmutante (PTS^{Fru}, PTS^{ManI}, PTS^{ManII}) ratsam. Wenn ausschließlich diese drei untersuchten PTS für die Fruktose-Aufnahme verantwortlich sind, so sollten die Doppelmutanten eine stärkere Wachstumsbeeinträchtigung aufweisen als bereits die Δfru -Mutante. Die Dreifach-

fachmutante sollte erwartungsgemäß nicht mehr dazu in der Lage sein auf Fruktose zu wachsen.

Darüber hinaus wäre es denkbar die Aufnahmerate von Fruktose in *C. acetobutylicum* zu bestimmen, wie es bereits für Glukose (Ounine *et al.*, 1985), Saccharose (Tangney und Mitchell, 2000) und auch Mannitol (Behrens *et al.*, 2001) erfolgt ist. Dabei wird die Substrat-spezifische Aufnahmerate durch die Zugabe von radioaktiv markierter D-[U-¹⁴C]-Fruktose zu Zellextrakten von *C. acetobutylicum* gemessen. Nach der Entnahme von Proben in bestimmten Zeitintervallen kann durch die Messung der Radioaktivität der gewaschenen Zellen bestimmt werden wieviel Substrat zu einem bestimmten Zeitpunkt aufgenommen wurde (Hutkins und Kashket, 1986). Um über die spezifischen Permease-Aktivitäten der drei untersuchten PTS (PTS^{Fru} , PTS^{ManI} , $\text{PTS}^{\text{ManII}}$) eine quantitative Aussage in Bezug auf die Fruktose-Aufnahme treffen zu können, sollte die Messung der Fruktose-Phosphorylierung nicht nur für den Wildtyp von *C. acetobutylicum* sondern auch für die drei generierten Defektmutanten erfolgen.

4.2 Die Regulation der Fruktose-Aufnahme in *C. acetobutylicum*

C. acetobutylicum besitzt die Eigenschaft eine Vielzahl von Kohlenhydraten als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können (López-Contreras *et al.*, 2004). Dabei gelten Hexosen wie Glukose, Fruktose und Mannose als bevorzugte Energiequellen (Servinsky *et al.*, 2010) und werden gegenüber Pentosen wie z. B. Xylose oder Arabinose privilegiert aufgenommen und verwertet (Ounine *et al.*, 1983; Sivagnanam *et al.*, 2011). Darüber hinaus stellt Glukose die präferierte C-Quelle aller Hexosen dar (Tangney *et al.*, 2003). Die Hexosen werden über den Embden-Meyerhof-Parnas-(EMP)-Stoffwechselweg, den sogenannten glykolytischen Weg, metabolisiert (Andreesen und Gottschalk, 1969; Thauer *et al.*, 1977). Unter natürlichen Bedingungen stehen *C. acetobutylicum* stets mehrere Kohlenhydrate gleichzeitig zur Verfügung. Doch die Verwertung dieser Kohlenhydrate unterliegt einer hierarchischen Struktur, d. h. das bevorzugte, primäre C-Quellen zuerst aufgenommen und verstoffwechselt werden. Erst wenn diese nahezu verbraucht worden sind, wird mit der Aufnahme sekundärer Kohlenhydrate begonnen. Um solch eine sequentielle Verwertung zu gewährleisten und nicht unnötig Energie zu verschwenden, werden die benötigten Enzyme bzw. Stoffwechselwege erst synthetisiert und aktiviert, wenn sie benötigt werden. Diese Art der Kontrolle wird als Katabolitenrepression (CCR) bezeichnet und erfolgt zumeist auf

Ebene der Transkription (Warner und Lolkema, 2003). Im Allgemeinen kann die Expression von katabolen Genen und Operonen sowohl einer negativen als auch einer positiven Regulation unterliegen. Dabei übt das „Catabolite control protein A“ (CcpA) als pleiotroper Regulator eine globale transkriptionelle Regulation aus, indem es entweder als Aktivator oder als Repressor von Genen des Kohlenhydrat-Transportes und deren Metabolismus in Gram-positiven Bakterien wirksam ist (Lorca *et al.*, 2005). Auch die veränderte Aktivität von spezifischen Regulatoren spielt eine Rolle in der CCR. Darüber hinaus benötigen katabole Gene und Operone sogenannte Induktoren, die deren hohe Expression ermöglichen (Brückner und Titgemeyer, 2002). Das für die Fruktose-Aufnahme maßgebliche PTS^{Fru} wird zusammen mit einem Regulator des Zuckermetabolismus (FruR) vom *fru*-Operon codiert. Dementsprechend kann sowohl eine Beteiligung von CcpA als auch FruR an der Regulation der Fruktoseaufnahme diskutiert werden. Im Nachfolgenden werden die einzelnen Aspekte der Regulation der Fruktose-Aufnahme näher beleuchtet und abschließend ein Regulationsmodell entwickelt, welches einen möglichen Ablauf der *in vivo*-Regulation in *C. acetobutylicum* darstellen soll.

4.2.1 Das Wachstum von *C. acetobutylicum* mit Glukose und Fruktose im Gemisch

Da Fruktose neben Glukose zu einer der präferierten C-Quellen von *C. acetobutylicum* gehört (Servinsky *et al.*, 2010), war die Reihenfolge der Verwertung beider C-Quellen im Gemisch bisher unklar. Ob Glukose gegenüber Fruktose in *C. acetobutylicum* bevorzugt aufgenommen und umgesetzt wird, war ein Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit. Die ersten Untersuchungen zur Aufnahme von zwei Kohlenhydraten aus einem Gemisch wurden von Jacque Monod in den Vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts durchgeführt (Monod, 1942; Monod, 1949). Dabei analysierte er unter anderem die Wachstumsraten von *E. coli* in chemisch definiertem Medium mit verschiedenen Zuckergemischen. Für einige Gemische, wie auch Glukose und Fruktose, konnte das Wachstum mit nur einer exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden, während für andere Gemische, wie z.B. Glukose und Laktose, ein sogenanntes diauxisches Wachstum mit zwei exponentiellen Wachstumsphasen auftrat (Roseman und Meadow, 1990). Auch für diverse andere Bakterien, wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* (Dominguez *et al.*, 1997) oder auch *C. beijerinckii* (Mitchell *et al.*, 1996), konnte eine gleichzeitige Verwertung von Glukose und Fruktose ermittelt werden. Demgegenüber konnte für *Halococcus saccharolyticus* gegenteiliges beobachtet werden (Johnsen *et al.*,

2001). Für *C. acetobutylicum* wurde bisher nur ein diauxisches Wachstum für Glukose und Laktat (Yu *et al.*, 2006) sowie Glukose und Xylose (Grimmler *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2012) beschrieben. Im Gegensatz zu den von Grimmler *et al.* (2010) durchgeführten Wachstumsversuchen für *C. acetobutylicum* mit einem Glukose-Xylose-Gemisch war für das Wachstum aller analysierten Stämme mit Glukose und Fruktose kein eindeutiges diauxisches Wachstum anhand der Wachstumskurven erkennbar. Dennoch zeigte sich ein Einbruch in der optischen Dichte nach ca. 24 h Wachstum, nachdem die Glukose nahezu vollständig aufgenommen worden war. Erst ca. 12 h später konnte eine erneute Zunahme der optischen Dichte verzeichnet werden. Dieses Verhalten trat nur bei der Fermentation beider Kohlenhydrate im Gemisch auf. Somit konnte zwar keine klassische diauxische Wachstumskurve beobachtet werden, aber dennoch traten Unterschiede im Vergleich zur Einzelaufnahme von Glukose oder Fruktose auf. Loomis und Magasanik konnten 1967 für *E. coli* zeigen, dass die Ausbildung der charakteristischen diauxischen Wachstumskurve nicht nur von den beiden verwendeten Kohlenhydraten abhängig ist, sondern auch von der Konzentration der sekundären C-Quelle. So blieb der diauxische Effekt bei hohen Konzentrationen des sekundären Substrates nahezu aus. Der größte diauxische Effekt konnte für ein Verhältnis von 1:1 beider Kohlenhydrate beobachtet werden (Roseman und Meadow, 1990). Das gewählte Verhältnis von Glukose zu Fruktose während der Versuche dieser Arbeit betrug 1:3. Möglicherweise wäre das Phänomen der Diauxie in *C. acetobutylicum* mit einem niedrigeren Verhältnis der beiden C-Quellen zueinander besser detektierbar gewesen.

In *C. acetobutylicum* konnte Fruktose simultan zu Glukose aufgenommen werden, was die Messung der Abnahme der Konzentration von Fruktose verdeutlicht. Aber im Gemisch von Fruktose und Glukose zeigte sich eine 3-fach geringere spezifische Aktivität der 1-PFK. Somit kann davon ausgegangen werden, dass zumindest die Fruktose-Aufnahme über das *fru*-Operon in Anwesenheit von Glukose gehemmt ist und erst mit dem Verbrauch der Glukose aktiviert wird. Ähnliches zeigte sich auch für *B. subtilis* und *L. lactis*. In diesen Organismen führte die Anwesenheit von Glukose im Medium zu einer drastischen Inhibierung der Fruktose-Aufnahmerate um 80 %. Darüber hinaus konnte für *B. subtilis* herausgestellt werden, dass der inhibierende Effekt der Fruktose-Aufnahme in Anwesenheit von Glukose durch die Phosphorylierung des HPr-Proteins am Serin-Rest (HPr-Ser-P) hervorgerufen wurde (Ye und Saier, 1996). Somit scheint der Transport von Fruktose auch der Katabolitenrepression zu unterliegen.

4.2.2 CcpA als Transkriptionsrepressor der Fruktose-Aufnahme

Die Katabolitenrepression in Gram-positiven Bakterien wird durch den Regulator CcpA vermittelt (Tobisch *et al.*, 1999) und konnte bisher in über 20 Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt identifiziert werden (Kraus *et al.*, 1998). CcpA gehört zur Familie der LacI/GalR Regulatoren (Weickert und Adhya, 1992) und bindet an ein spezifisches Sequenzmotiv, die sogenannte *cre*-Sequenz (Gösseringer *et al.*, 1997; Miwa und Fujita, 2001). Dabei bindet CcpA als Homodimer an die *cre*-Sequenz und die Affinität der Bindung wird durch den Co-Repressor HPr-Ser-P verstärkt (Deutscher *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997). Dieser in Gram-positiven Bakterien konservierte pleiotrope Regulator besitzt eine enorme Relevanz für diverse zelluläre Prozesse, z. B. für die Biofilm-Bildung (Varga *et al.*, 2008) und eine effiziente Sporulation in *C. perfringens* (Varga *et al.*, 2004), sowie für die Toxin-Synthese in *C. difficile* (Antunes *et al.*, 2011). Auch für *C. acetobutylicum* konnte nachgewiesen werden, dass CcpA mit der Lösungsmittelproduktion, der Sporulation und der Regulation der Kohlenhydrat-Aufnahme assoziiert ist (Ren *et al.*, 2012). Bei der Anwesenheit von Glukose im Medium fungiert CcpA als Aktivator von Genen des Glukose-spezifischen PTS, wodurch die Glukoseaufnahme verstärkt wird. Zum anderen vermittelt es gleichzeitig die Repression des Transportes anderer C-Quellen (Stülke und Hillen, 2000). Mit Hilfe einer CcpA-Defektmutante untersuchten Ren *et al.* (2012) den Einfluss von CcpA auf die Kohlenhydrataufnahme und dessen Metabolismus. Der Vergleich des Transkriptoms der CcpA-Mutante und des Wildtyps von *C. acetobutylicum* offenbarte eine Induktion der Expression von 98 Genen, die in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Transport und Metabolismus von „nicht-Glukose“ Kohlenhydraten wie u. a. Fruktose, Mannose, Laktose und Saccharose stehen. Dazu zählten auch die Operone der drei untersuchten PTS - PTS^{Fru}, PTS^{ManI} und PTS^{ManII}.

Die Regulation von CcpA findet auf transkriptioneller Ebene statt. Gene die durch CcpA reprimiert werden, besitzen generell eine *cre*-Bindestelle im oder stromabwärts ihres Promotors. Demgegenüber sind die *cre*-Sequenzen CcpA-aktivierter Gene stromaufwärts des Promotors lokalisiert (Henkin, 1996). Die Katabolitenrepression wird somit durch die Bindung von CcpA an die *cre*-Bindestelle vermittelt, indem die Interaktion der RNA-Polymerase mit dem Promotor verhindert wird bzw. die Transkription nachfolgender Gene blockiert wird (Deutscher *et al.*, 1997). Nicht nur die Lage der *cre*-Box relativ zum Promotor, sondern auch ihre Sequenz ist für die Art und Intensität der Bindung wichtig. Generell besitzt das *cre*-Motiv aus *B. subtilis* nur eine gering konser-

vierte Konsensussequenz ($T_1G_2A_3A_4A_5R_6C_7G_8Y_9T_{10}W_{11}W_{12}C_{13}A_{14}$), wobei besonders die Basen G_2 , C_7 und G_8 als hoch konserviert bekannt sind (Miwa *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2010). So konnte für *B. subtilis* zwischen starken und schwachen *cre*-Boxen hinsichtlich ihrer Basenfolge unterschieden werden. Dabei sind starke Boxen durch ihre hohe Affinität zu CcpA definiert, wobei dieses Protein bereits in geringen Konzentrationen an sie binden kann. Neben den drei besonders stark konservierten Resten konnten zudem G_6 , C_9 , C_{13} und A_{14} besonders in starken *cre*-Boxen identifiziert werden (Marciak *et al.*, 2012). Auch für die ermittelte *cre*-Sequenz vor dem *fru*-Operon in *C. acetobutylicum* konnten sowohl die drei konservierten Basen G_2 , C_7 und G_8 als auch zwei für starke *cre*-Boxen indikative Reste (C_{13} und A_{14}) gefunden werden. Zudem befindet sie sich im Promotor des *fru*-Operons und überlappt mit der -10-Region, was auf eine Repression durch CcpA schließen lässt.

Um herauszufinden, ob auch das *fru*-Operon in *C. acetobutylicum* tatsächlich der Katabolitenrepression unterliegt, wurden Bindestudien mit CcpA und der mutmaßliche *cre*-Sequenz durchgeführt. Wie bereits erwähnt, bindet CcpA als Dimer normalerweise zusammen mit dem Co-Repressor HPr-Ser-P an die *cre*-Boxen und ist somit für die Repression verantwortlich. Doch zumindest *in vitro* konnte mehrfach gezeigt werden, dass auch ohne HPr-Ser-P eine Bindung von CcpA an die *cre*-Box möglich ist (Kowalczyk *et al.*, 2007; Antunes *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurden nur Band Shift-Analysen (EMSA) ohne HPr-Ser-P durchgeführt. Anhand der gezeigten Shift-Experimente konnte eine Bindung von CcpA an die identifizierte *cre*-Sequenz im Promotorbereich des *fru*-Operons nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle diente die bereits bekannte und experimentell belegte Bindung von CcpA an die *cre*-Sequenz vor dem *xyl*-Operon (Ren *et al.*, 2012). Das bedeutet, dass auch *in vivo* von einer Regulation der Transkription des *fru*-Operons durch CcpA ausgegangen werden kann.

4.2.3 FruR als Transkriptionsaktivator der Fruktose-Aufnahme

An der Kohlenhydrat-Aufnahme-beteiligte Gene und Operone werden nicht nur durch spezifische Kontrollproteine reguliert, sondern sie benötigen auch eine spezifische Induktion damit die Aufnahme ihres zu katabolisierenden Substrates effizient erfolgen kann (Brückner und Titgemeyer, 2002). In Anwesenheit der spezifischen C-Quelle kann die Regulation der Aufnahme durch verschiedene Induktions-Mechanismen ausgelöst werden. Dazu zählen die Derepression, Aktivierung und die Antitermination (Tangney und Mitchell, 2005; Görke und Stülke, 2008). Dabei spielen zumeist Substrat-

spezifische Regulatorproteine eine Rolle, die ihre Funktion durch Bindung vor dem jeweiligen Operon ausüben. Oft sind die Gene solcher Regulatoren mit dem Operon assoziiert oder aber werden direkt als Teil des selbigen zusammen mit den Genen für die Aufnahme des Substrats codiert (Tangney und Mitchell, 2005). In Bezug auf die Fruktose-Aufnahme konnte in dem dafür hauptsächlich verantwortlichen *fru*-Operon in *C. acetobutylicum* ein solcher Regulator identifiziert werden. Dieser Regulator FruR wird von dem ersten Gen des Operons codiert und ist als „Regulator des Zuckerkatabolismus“ annotiert. Aufgrund seiner Sequenzhomologie zu bereits bekannten Regulatoren wurde er in die Familie der DeoR-Transkriptionsregulatoren eingeordnet (Nölling *et al.*, 2001). Regulatoren der DeoR-Familie konnten bisher sowohl in Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien gefunden werden (Saier und Ramseier, 1996; Barrière *et al.*, 2005; Engels und Wendisch, 2007; Monedero *et al.*, 2007). Sie zeichnen sich durch ein N-terminales Helix-Turn-Helix-(HTH)-Motiv und eine C-terminale Multimerisierungs- und/oder Effektor-Bindedomäne aus (Garces *et al.*, 2008). Für gewöhnlich agieren sie als Repressoren des Zuckerkatabolismus durch die Bindung an mehrere Operatorbindestellen in der Promotorregion ihres Zieloperons (Elgrably-Weiss *et al.*, 2006).

Die Regulation des *fru*-Operons in Verbindung mit der Funktion von FruR wurde bisher in diversen Gram-positiven Organismen wie z. B. *L. lactis*, *C. glutamicum* und *Streptococcus gordonii* untersucht. In diesen Organismen wurde FruR ausschließlich als Repressor des *fru*-Operons beschrieben (Barrière *et al.*, 2005; Toyoda *et al.*, 2009; Loo *et al.*, 2003). In *Spiroplasma citri* hingegen wurde FruR die Funktion eines Aktivators zugeschrieben (Gaurivaud *et al.*, 2001). Daher wurde zu Beginn der Arbeiten die Hypothese aufgestellt, dass FruR aus *C. acetobutylicum* nicht nur in die Aufnahme von Fruktose involviert ist, sondern dass es sich ebenfalls um einen Repressor handelt. Damit FruR überhaupt eine Beteiligung an der Regulation der Fruktoseaufnahme zugesprochen werden konnte, musste zunächst für FruR eine Bindestelle vor dem *fru*-Operon identifiziert werden. Einen ersten Anhaltspunkt lieferten bereits bekannte Operatorbindestellen anderer FruR-Regulatoren (Barrière *et al.*, 2005; Loo *et al.*, 2003; Gaigalat *et al.*, 2007). Die postulierte Bindestelle von Barrière *et al.* (2005) konnte auch stromaufwärts des *fru*-Operons in *C. acetobutylicum* gefunden werden. Diese besteht aus vier benachbarten 10-Bp-Wiederholungen, wobei die ersten beiden Basen eines jeden Repeats (T_1G_2) hoch konserviert sind. Die durchgeführten Bindestudien mit FruR verifizierten dessen Bindung im Promotorbereich des *fru*-Operons. Auch für die Promo-

torregionen der *fru*-Operone von *B. subtilis*, *L. lactis* und *S. pyogenes* und weiterer Gram-positiver Bakterien ließ sich dieses Bindemotiv finden (Barrière *et al.*, 2005). Interessanterweise überlappte das Motiv in den meisten Fällen mit der -35-Region des Promoters, was auf eine negative Regulation hindeutet. Im Gegensatz dazu ist das Bindemotiv vor dem *fru*-Operon stromaufwärts der -35-Region lokalisiert, welches auf eine Aktivatorbindestelle schließen lässt (Rojo, 1999; Knippers, 2006). Um zu klären, ob es sich bei FruR aus *C. acetobutylicum* um einen Aktivator oder Repressor der Fruktose-Aufnahme handelt, wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen führte die Deletion von *fruR* zum funktionalen Ausfall der regulatorischen Funktion von FruR. Der Verlust des Regulators in der generierten Defektmutante $\Delta fruR$ führte zu einer deutlichen Inhibition des Wachstums auf Fruktose, ähnlich dem Verlust des gesamten *fru*-Operons. Daraus kann angenommen werden, dass FruR als Aktivator des *fru*-Operons fungiert. Im Falle einer reprimierenden Funktion hätte die Deletion keinen Einfluss auf das Wachstum mit Fruktose als Substrat wie für *L. lactis* gezeigt werden können (Barrière *et al.*, 2005). Andererseits führte die homologe Expression von FruR im Wildtyp zu einer gesteigerten Wachstumsrate auf Fruktose, was ebenfalls die Aktivator-Theorie unterstützt. Wie bereits gezeigt wurde, unterliegt die Expression des *fru*-Operons der Katabolitenrepression durch die Anwesenheit von Glukose im Medium. Zusätzlich offenbarte die Messung der spezifischen Aktivität der 1-PFK, dass die Induktion des *fru*-Operons durch FruR reguliert zu sein scheint, da durch den Verlust des Regulators eine verminderte spezifische Aktivität gemessen werden konnte.

Da die Induktion des *fru*-Operons Substrat-spezifisch ist (Servinsky *et al.*, 2010), wird die Bindung von FruR möglicherweise durch einen Effektor vermittelt. Generell gelten für Regulatoren der DeoR-Familie phosphorylierte Intermediate des jeweilig relevanten Stoffwechselweges als Effektormoleküle (Bartkus und Mortlock, 1986; Ray und Larson, 2004). Demnach kommen besonders F-1-P und FBP als potentielle Effektoren in Frage. Für FruR aus *L. lactis* und SugR aus *C. glutamicum* konnte anhand von Bindestudien nachgewiesen werden, dass deren Bindung durch geringe Konzentrationen von F-1-P (50 µM) bzw. hohe Konzentrationen von FBP (5 mM) gelöst und somit die Repression aufgehoben wird (Barrière *et al.*, 2005; Gaigalat *et al.*, 2008). Bei Anwesenheit von Fruktose im Medium wird diese aufgenommen und gleichzeitig zu F-1-P umgesetzt. Dieses Intermediat bindet an seine C-terminal gelegene Induktörbindestelle im FruR-Protein (Elgrably-Weiss *et al.*, 2006). Die Bindung von F-1-P hat eine Konformationsänderung des FruR-Proteins zur Folge, woraufhin dieses seine Bindung an den

Promotor löst und nicht mehr seine Funktion als Repressor ausüben kann. Somit kann die RNA-Polymerase an den Promotor des *fru*-Operons binden und die Transkription initiieren.

Wie anhand der durchgeführten EMSAs nachzuvollziehen ist, übte weder F-1-P noch FBP in den gewählten Konzentrationen einen Einfluss auf die Bindung von FruR an seine Bindestelle aus. Daher konnte zumindest die Vermutung bestätigt werden, dass FruR nicht als Repressor des *fru*-Operons fungiert, da ein negativer Effekt der beiden Intermediate des Fruktose-Metabolismus auf die Bindung ausblieb. Ob F-1-P bzw. FBP zu einer Verstärkung der Bindung von FruR an seinem Bindemotiv führen, ließ sich anhand der gewählten Bedingungen aber auch weder bestätigen noch dementieren. Anhand von Bindestudien mit verschiedenen LacR-Varianten aus *L. lactis*, konnten die vier Aminosäurereste Lys-72, Lys-80, Lys-213 und Asp-210 identifiziert werden, welche für die Bindung von dessen Induktor Targatose-6-Phosphat und folglich für die Induktion der Expression des *lac*-Operons essentiell sind (van Rooijen *et al.*, 1993). Auch für FruR aus *C. acetobutylicum* konnten diese konservierten AS-Reste gefunden werden, jeweils um einen AS-Rest verschoben (Lys-71, Lys-79, Lys-212 und Asp-209). Demnach kann gefolgert werden, dass eine Beeinflussung der Funktion von FruR durch einen oder mehrere Effektoren wahrscheinlich ist, jedoch bleibt unklar welche Metabolite dafür verantwortlich sind. Es ist bekannt, dass DeoR-Transkriptionsregulatoren neben der Effektorbindedomäne zusätzlich bzw. ausschließlich eine Multimerisierungsdomäne besitzen können, die für eine effektive Regulation notwendig sein kann. DeoR-Regulatoren kommen sowohl als Octamere (DeoR aus *E. coli*) als auch Tetramere (AgaR und UlaR aus *E. coli*) vor (Hirooka *et al.*, 2012; Mortensen *et al.*, 1989; Garces *et al.*, 2008). Auch für FruR aus *C. acetobutylicum* wäre eine Multimerisierung für eine Ausübung seiner aktivierenden Funktion denkbar. Einen ersten Hinweis darauf lieferten die durchgeführten Bindestudien. Die DNA-Protein-Komplexe konnten nicht in Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden, da dabei stets die Proben in den Geltaschen verblieben. Dies deutet darauf hin, dass die gebildeten Komplexe für die verwendeten Gele zu groß waren und daher gar nicht in die Gelmatrix einzuwandern vermochten.

4.2.4 Regulationsmodell der Fruktose-Aufnahme

Aufgrund der erzielten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Fruktose-Aufnahme in *C. acetobutylicum* im Vergleich zu der in anderen Organismen wie *E. coli*, *S. gordonii* und *L. lactis* gegensätzlich abläuft. In diesen Bakterien unterliegt die Aufnahme von Fruktose einer negativen Regulation, wobei das Regulatorpro-

tein FruR die Funktion des Repressors übernimmt (Geerse *et al.*, 1986; Loo *et al.*, 2003; Barrière *et al.*, 2005). Solange keine Fruktose im Medium vorhanden ist, wird die Transkription des *fru*-Operons in diesen Organismen durch die Bindung von FruR an den Operon-eigenen Promotor inhibiert. Für das *fru*-Operon aus *C. acetobutylicum* konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass es keiner Repression durch FruR in Abwesenheit von Fruktose unterliegt. Vielmehr stellt FruR den Aktivator des *fru*-Operons dar, der bei Anwesenheit von Fruktose im Medium stromaufwärts der -35-Region an seine Zielsequenz bindet.

Mit Hilfe der erzielten Ergebnisse lässt sich für die Fruktose-Aufnahme ein mögliches Regulationsmodell ableiten, welches nachfolgend erläutert wird (Abb. 4.2). Das *fru*-Operon spielt sowohl beim Transport als auch beim Abbau von Fruktose eine wichtige Rolle in *C. acetobutylicum*. Bisher konnte durch Transkriptionsstudien und Northern Blot Analysen aufgezeigt werden, dass dieses Operon einer Substrat-spezifischen Induktion unterliegt (Servinsky *et al.*, 2010) und die Gene erst exprimiert werden, wenn Fruktose im Medium vorhanden ist. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass das *fru*-Operon in *C. acetobutylicum* sowohl einer negativen als auch einer positiven Kontrolle unterliegt. In Anwesenheit von Glukose im Medium, einer bevorzugten C-Quelle, wird das *fru*-Operon durch die Katabolitenrepression reguliert (Abb. 4.2a). Dabei bindet CcpA zusammen mit seinem Co-Faktor HPr-Ser-P an die *cre*-Sequenz, die mit der -10 Region des *fru*-Promotors überlappt. Durch die sogenannte sterische Hindernis ist es der RNA-Polymerase nicht möglich an den *fru*-Promotor zu binden, wodurch die Transkription blockiert wird (van Hijum *et al.*, 2009; Rojo, 1999).

Wenn keine Glukose mehr vorhanden ist, dann wird die Bindung von CcpA an die *cre*-Box aufgehoben. Eine effiziente Transkription des *fru*-Operons wird aber nicht nur durch die alleinige Abwesenheit von Glukose im Medium induziert. Für eine effiziente Transkription bedarf es einer Aktivierung des *fru*-Operons, wie für andere C-Quellen z. B. Laktose bereits bewiesen wurde (Yu *et al.*, 2006). Erst wenn Fruktose im Medium vorhanden ist (Abb. 4.2b), wird FruR durch seinen Effektor gebunden und kann als Multimer an sein Sequenzmotiv binden. FruR fungiert hierbei vermutlich als Klasse I-Aktivator, welcher seine Bindung an verschiedenen Stellen stromaufwärts der -35-Region durch direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase die Transkription deutlich erhöht. Gewöhnlich sind deren Aktivatorbindestellen nahe der Positionen -61 Bp bis -91 Bp lokalisiert, welches auch auf die identifizierte FruR-Bindestelle (-41 Bp bis -88 Bp) zutrifft (Browning und Busby, 2004; Barnard *et al.*, 2004).

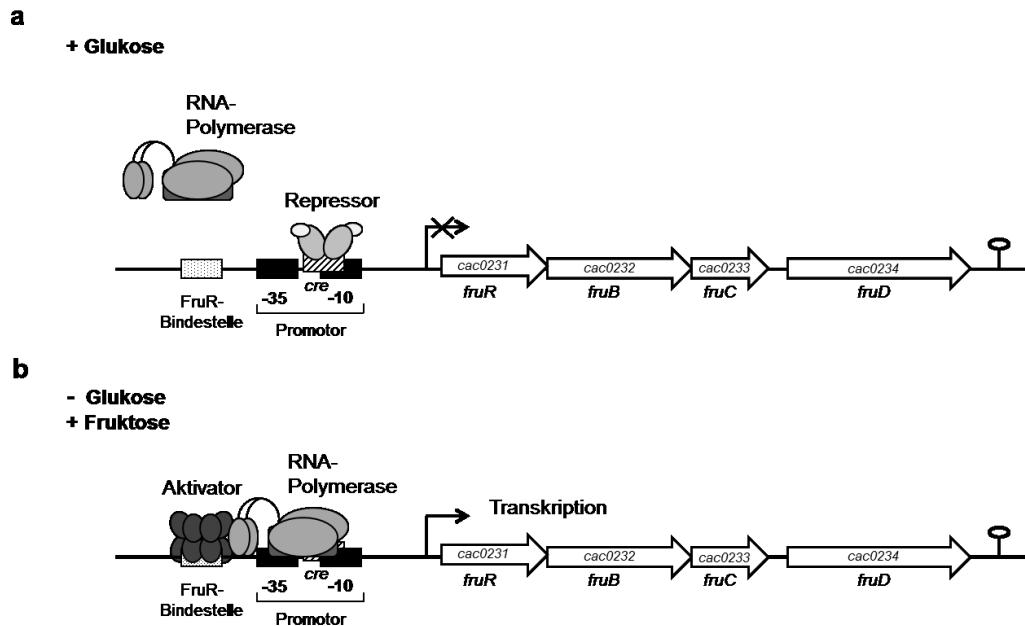


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Transkriptionregulation des *fru*-Operons in *C. acetobutylicum*. In Anwesenheit von Glukose (a) wird die Transkription des *fru*-Operons durch die Bindung von CcpA und HPr-Ser-P an die *cre*-Box reprimiert, indem die RNA-Polymerase durch die sterische Hinderung nicht an den Promotor binden kann. Für eine effiziente Transkription des *fru*-Operons (b) bedarf es der Anwesenheit von Fruktose im Medium, wodurch die Bindung des Aktivators FruR an seine Bindestelle induziert wird. Durch die Bindung von FruR kann dieser direkt mit der RNA-Polymerase interagieren, wodurch die Transkription des *fru*-Operons erst optimal erfolgen kann.

Fruktose- und Glukosemetabolismus unterscheiden sich in *C. acetobutylicum* lediglich hinsichtlich der ersten Schritte (Abb. 4.1). Demnach entsteht bei der Fruktose-Aufnahme wie bei der Glukose-Verwertung das glykolytische Intermediat FBP, welches maßgeblich an der Katabolitenrepression beteiligt ist (Görke und Stölke, 2008). Wenn die Initiation der Transkription des *fru*-Operons keiner Induktion durch den Aktivator FruR unterliegen würde, so würde theoretisch CcpA im *fru*-Promotor binden und die Aufnahme von Fruktose reprimieren. Die Bindung des Aktivators FruR führt aber wahrscheinlich dazu, dass die Transkription des *fru*-Operons aktiviert bleibt und sich nicht selbst reprimiert, solange Fruktose im Medium vorhanden ist.

5. Zusammenfassung

Kohlenhydrate werden von *C. acetobutylicum* als bevorzugtes Substrat verwendet. Ihre Aufnahme erfolgt maßgeblich durch 13 Phosphotransferase Systeme (PTS). Drei dieser PTS (PTS^{Fru} , PTS^{ManI} , $\text{PTS}^{\text{ManII}}$) konnten durch Sequenzhomologien und Transkriptomanalysen mit der Aufnahme von Fruktose in Verbindung gebracht werden.

1. Durch die Konstruktion der drei Defektmutanten *C. acetobutylicum* Δfru , *C. acetobutylicum* $\text{manI}::\text{int}$ und *C. acetobutylicum* ΔmanII und deren wachstumsphysiologischer Charakterisierung mit Fruktose als C-Quelle konnte das PTS^{Fru} als Hauptaufnahmesystem für Fruktose bestätigt werden.

2. Northern Blot-Analysen des Wildtyps von *C. acetobutylicum* und die Messung der 1-Phosphofruktokinase-Aktivität zeigten, dass das *fru*-Operon Substrat-spezifisch durch Fruktose induziert wird.

3. Die Analyse der Promotorregion des *fru*-Operons führte zur Identifikation einer putativen FruR-Bindestelle stromaufwärts des *fru*-Promotors. Für das Protein CcpA, welches die Katabolitenrepression steuert, konnte im *fru*-Promotor eine mögliche Bindestelle (*cre*-Box) gefunden werden.

Der Nachweis der spezifischen Bindung des heterolog exprimierten FruR-Proteins und des CcpA-Proteins aus *C. acetobutylicum* an die Promotorregion des *fru*-Operons erfolgte mit Hilfe von Bindestudien.

4. Anhand von statischen Kulturen von *C. acetobutylicum* mit einem Gemisch aus Glukose und Fruktose als Substrat konnte keine sequentielle Aufnahme der beiden C-Quellen beobachtet werden. Dennoch war die Aktivität der 1-Phosphofruktokinase durch das Vorhandensein von Glukose im Medium reprimiert. Demnach unterliegt die Expression des *fru*-Operons der Katabolitenrepression durch CcpA.

5. Der Verlust des Regulators FruR in dem Deletionsstamm ΔfruR führte zu einer verminderten Fruktose-Aufnahme in *C. acetobutylicum*. Die homologe Überexpression von FruR im Wildtyp von *C. acetobutylicum* resultierte in einem gesteigerten exponentiellen Wachstum. Dies deutet darauf hin, dass FruR als Aktivator des *fru*-Operons an der Regulation der Fruktose-Aufnahme beteiligt ist.

6. Literaturverzeichnis

Alsaker KV, Papoutsakis ET. 2005. Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **187**:7103-7118.

Andreesen J, Gottschalk G. 1969. The occurrence of a modified Entner-Doudoroff pathway in *Clostridium aceticum*. *Archives of Microbiology* **69**:160-170.

Antunes A, Martin-Verstraete I, Dupuy B. 2011. CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. *Mol. Microbiol.* **79**:882-899.

Antunes A, Camiade E, Monot M, Courtois E, Barbut F, Sernova NV, Rodionov DA, Martin-Verstraete I., Dupuy B. 2012. Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. *Nucleic Acids Res.* **40**:10701-10718.

Bahl H., Dürre P. 1993. Clostridia, p. 285-323. In H. Sahm (ed.), Biotechnology, 2nd ed., vol. 1. VCH-Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

Barabote RD, Saier MH Jr. 2005. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:608-634.

Barnard A, Wolfe A, Busby S. 2004. Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Current Opinion in Microbiology* **7**:102-108.

Barrière C, Veiga-da-Cunha M, Pons N, Guedon E, van Hijum SA, Kok J, Kuipers OP, Ehrlich DS, Renault P. 2005. Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low-GC gram-positive bacteria: its regulator, signal, and DNA-binding site. *J. Bacteriol.* **187**:3752-3761.

Bartkus JM, Mortlock RP. 1986. Isolation of a mutation resulting in constitutive synthesis of L-fucose catabolic enzymes. *J Bacteriol* **165**:710-714.

Behrens S, Mitchell WJ, Bahl H. 2001. Molecular analysis of the mannitol operon of *Clostridium acetobutylicum* encoding a phosphotransferase system and a putative PTS-modulated regulator. *Microbiology* **147**:75-86.

Benthin S, Nielsen J, Villadsen J. 1993. Two uptake systems for fructose in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 produce glucolytic and gluconeogenic fructose phosphates and induce oscillations of growth and lactic acid formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3206-3211.

Bergmeyer HU. 1983. Methods in enzymatic analysis. Verlag Chemie Weinheim, Germany.

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

Binet MRB, Rager MN, Bouvet OMM. 1998. Fructose and mannose metabolism in *Aeromonas hydrophila*: identification of transport systems and catabolic pathways. *Microbiology* **144**:1113-1121.

Birnboim, HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

Bourassa S, Vadeboncoeur C. 1992. Expression of an inducible enzyme II fructose and activation of a cryptic enzyme II glucose in glucose-grown cells of spontaneous mutants of *Streptococcus salivarius* lacking the low-molecular-mass of IIIman, a component of the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system. *J Gen Microbiol* **138**:769-777.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

- Breznak JA, Costilow RN.** 1994. Physiochemical factors of growth. p. 137-154. In: Gerhardt (ed). Methods of general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
- Browning DF, Busby SJW.** 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:57-65.
- Brückner R, Titgemeyer F.** 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**:141-148.
- Chen L, Xin C, Deng P, Ren J, Liang H, Bai F.** 2010. Butanol production from hydrolysate of Jerusalem artichoke juice by *Clostridium acetobutylicum* L7. *Chinese Journal of Biotechnology* **26**:991-6.
- Cooksley CM, Zhang Y, Wang H, Redl S, Winzer K, Minton NP.** 2012. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway. *Metab Eng* **14**:630-641.
- Deutscher J, Küster E, Bergstedt U, Charrier V, Hillen W.** 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **15**:1049-1053.
- Deutscher J, Fischer C, Charrier V, Galinier A, Lindner C, Darbon E, Dossonnet V.** 1997. Regulation of carbon metabolism in Gram-positive bacteria by protein phosphorylation. *Folia Microbiol.* **42**:171-178.
- Deutscher J, Francke C, Postma PW.** 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:939-1031.
- Dominguez H, Cocaign-Bousquet M, Lindley ND.** 1997. Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:600-603.

- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**:6127-6145.
- Elgrably-Weiss M, Schlosser-Silverman E, Rosenshine I, Altuvia S.** 2006. DeoT, a DeoR-type transcriptional regulator of multiple target genes. *FEMS Microbiol Lett* **254**:141-148.
- Engels V, Wendisch VF.** 2007. The DeoR-Type regulator SugR represses expression of ptsG in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**:2955-2966.
- Ferenci T, Kornberg HL.** 1971a. Pathway of fructose utilization by *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **13**:127-130.
- Ferenci T, Kornberg HL.** 1971b. Role of Fructose-1,6-Diphosphatase in fructose utilization by *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **14**:360-363.
- Fond O, Petitdemange E, Petitdemange H, Gay R.** 1984. Effect of glucose flow on the acetone butanol fermentation in fed batch culture. *Biotechnol. Lett.* **6**:13-18.
- Fujita Y.** 2009. Carbon Catabolite Control of the Metabolic Network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**:245-259.
- Gaigalat L, Schlüter JP, Hartmann M, Mormann S, Tauch A, Pühler A, Kalinowski J.** 2007. The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Mol Biol* **8**:104.
- Galinier A, Kravanja M, Engelmann R, Hengstenberg W, Kilhoffer MC, Deutscher J, Haiech J.** 1998. New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci* **95**:1823-1828.

- Garces F, Fernández FJ, Gómez AM, Pérez-Luque R, Campos E, Prohens R, Aguilar J, Baldomà L, Coll M, Badía J, Vega C.** 2008. Quaternary structural transitions in the DeoR-type repressor UlaR control transcriptional readout from the L-ascorbate utilization regulon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **47**:11424-11433.
- Gaurivaud P, Laigret F, Garnier M, Bove JM.** 2001. Characterization of FruR as a putative activator of the fructose operon of *Spiroplasma citri*. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**:73-78.
- Gautheret D, Lambert A.** 2001. Direct RNA Motif Definition and Identification from Multiple Sequence Alignments using Secondary Structure Profiles. *J Mol Biol.* **313**:1003-11.
- Gauthier L, Myrand D, Vadeboncoeur C.** 1984. Isolation of a novel protein involved in the transport of fructose by an inducible phosphoenolpyruvate fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **160**:755-763.
- Geerse RH, Ruig CR, Schuitema ARJ, Postma PW.** 1986. Relationship between pseudo-HPr and the PEP:fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **203**:435-444.
- Girbal L, Von Abendroth G, Winkler M, Benton PM, Meynil-Salles I, Croux I, Peters JW, Happe T, Soucaille P.** 2005. Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl Environ Microbiol* **71**:2777-2781.
- Görke B, Stülke J.** 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol.* **6**:613-624.
- Green EM.** 2011. Fermentative production of butanol - the industrial perspective. *Curr Opin Biotechnol* **22**:337-343.

Grimmler C, Held C, Liebl W, Ehrenreich A. 2010. Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of D-glucose and D-xylose. *J Biotechnol* **150**:315-323.

Gösseringer R, Küster E, Galinier A, Deutscher J, Hillen W. 1997. Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. *J Mol Biol* **266**:665-676.

Guédon E, Jarnet E, Renault P. 2002. Gene regulation in *Lactococcus lactis*: the gap between predicted and characterized regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**:93-112.

Häggström L. 1985. Acetone–butanol fermentation and its variants. *Biotechnol Adv* **3**:13-28.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.

Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET. 2002. Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **184**:3586-97.

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

Heap JT, Cartman ST, Pennington OJ, Cooksley CM, Scott JC, Blount B, Burns DA, Minton NP. 2009. Development of Genetic Knock-out Systems for Clostridia. In Clostridia - Molecular Biology in the Post-genomic Era- Norfolk, pp. 179–198. Edited by H. Brüggemann and G. Gottschalk. UK, Caister Academic Press. 16.

Heap JT, Kuehne SA, Ehsaan M, Cartman ST, Cooksley CM, Scott JC, Minton NP. 2010. The ClosTron: mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J Microbiol Methods* **80**:49-55.

- Henkin, TM.** 1996. The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:9-15.
- Herrero AA.** 1983. End-product inhibition in anaerobic fermentations. *Trends Biotechnol.* **1**:49-53.
- van Hijum SA, Medema MH, Kuipers OP.** 2009. Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**:481-509.
- Hirooka K, Edahiro T, Kimura K, Fujita Y.** 2012. Direct and Indirect Regulation of the *ycnKJI* Operon involved in copper uptake through two transcriptional repressors, YcnK and CsoR, in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **194**:5675-5687.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
- Huang L, Forsberg CW, Gibbens LN.** 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1230-1234.
- van Hugo H, Gottschalk G.** 1974. Distribution of 1-Phosphofructokinase and PEP:Phosphotransferase Activity in Clostridia. *FEBS Lett.* **46**:106-108.
- Hutkins RW, Kashket ER.** 1986. Phosphotransferase Activity in *Clostridium acetobutylicum* from Acidogenic and Solventogenic Phases of Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1121-1123.
- Janssen H.** 2010. Das Proteom und Transkriptom von *Clostridium acetobutylicum* bei unterschiedlichen pH-Werten im Chemostaten. Dissertation. Universität Rostock.
- Johnsen U, Selig M, Xavier KB, Santos H, Schonheit P.** 2001. Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*. *Arch Microbiol* **175**:52-61.

Jones BE, Dossonnet V, Küster E, Hillen W, Deutscher J, Klevit RE. 1997. Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem* **272**:26530-26535.

Jones DT, Woods DR. 1986. Aceton-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiol. Rev.* **50**:484-524.

Kell DB, Peck MW, Rodger G, Morris JG. 1981. On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**:81-88.

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

Kornberg HL, Lambourne LTM, Sprout AA. 2000. Facilitated diffusion of fructose via the phosphoenolpyruvate / glucose phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:1808-1812.

Kornberg HL. 2001. Routes for fructose utilization by *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**:355-9.

Kotrba P, Inui M, Yukawa H. 2001. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J. Biosci. Bioeng.* **92**:502-517.

Kowalczyk M, Borcz B, Plochocka D, Bardowski J. 2007. In vitro DNA binding of purified CcpA protein from *Lactococcus lactis* IL 1403. *Acta Biochim. Pol.* **54**:71-78.

Kraus A, Küster E, Wagner A, Hoffmann K, Hillen W. 1998. Identification of a co-repressor binding site in catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* **30**:955-963.

Kundig W, Ghosh S, Roseman S. 1964. Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **52**:1067-1074.

- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lee SY, Park JH, Jang SH, Nielsen LK, Kim J., Jung KS.** 2008. Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnol Bioeng* **101**:209-228.
- Lee JY, Jang YS, Lee J, Papoutsakis ET, Lee SY.** 2009. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* M5 for highly selective butanol production. *Biotechnol J* **4**:1432-1440.
- Lehmann D.** 2008. Das Cap0129-Protein in *Clostridium acetobutylicum*, essentiell für Granulose-Granula? Diplomarbeit, Universität Rostock.
- Lehmann D.** 2012. Neue Einblicke in den Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.
- Lehmann D, Hönicke D, Ehrenreich A, Schmidt M, Weuster-Botz D, Bahl H, Lütke-Eversloh T.** 2012. Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: Physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**:743-754.
- Ljungdahl LG, Hugenholtz J, Wiegel J.** 1989. Acetogenic and acid-producing clostridia. In Clostridia, pp. 145-191. Edited by NP Minton and DJ Clarke. Biotechnology handbooks; 3, Plenum Press, New York.
- Loo CY, Mitrakul K, Voss IB, Hughes CV, Ganeshkumar N.** 2003. Involvement of an inducible fructose phosphotransferase operon in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *J. Bacteriol.* **185**:6241-6254.
- Loomis WF Jr, Magasanik B.** 1967. Glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**:1397-1401.

- López-Contreras AM, Gabor K, Martens AA, Renckens BAM, Claassen PAM, van der Oost J, de Vos WM.** 2004. Substrate-Induced Production and Secretion of Cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5238-5243.
- Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, Weyler W, Schilling CH, Saier Jr. MH.** 2005. Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J. Bacteriol.* **187**:7826-7839.
- Lütke-Eversloh T, Bahl H.** 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology* **22**:634-47.
- Macke T, Ecker D, Gutell R, Gautheret D, Case DA and Sampath R.** 2001. RNAMotif – A new RNA secondary structure definition and discovery algorithm. *Nucleic Acids Res.* **29**:4724-4735.
- Madigan MT, Martinko JM.** 2006. Brock Mikrobiologie, 11., überarbeitete Auflage, Pearson Studium, München.
- Marciniak B, Pabijaniak M, de Jong A, Duhring R, Seidel G, Hillen W, Kuipers O.** 2012. High- and low-affinity cre boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. *BMC Genomics* **13**:401.
- Mermelstein LD, Welker NE, Bennett GN, Papoutsakis ET.** 1992. Expression of Cloned Homologous Fermentative Genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technol.* **10**:190-195.
- Mermelstein LD, Papoutsakis ET.** 1993. In vivo methylation in *Escherichia coli* by *Bacillus subtilis* Phage Φ3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1077-1081.

Meyer CL, Papoutsakis ET. 1989. Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**:450-459.

Mijakovic I, Poncet S, Galinier A, Monedero V, Fieulaine S, Janin J, Nessler S, Marquez JA, Scheffzek K, Hasenbein S, Hengstenberg W, Deutscher J. 2002. Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: A relic of early life? *Proc Natl Acad Sci.* **99**:13442-13447.

Mitchell WJ, Booth IR. 1984. Characterisation of the *Clostridium pasteurianum* phosphotransferase system. *J. Gen. Microbiol.* **130**:2193-2200.

Mitchell WJ. 1996. Carbohydrate uptake and utilization by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Anaerobe* **2**:379-384.

Mitchell WJ. 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv. Mic. Physiol.*, **39**:31.

Mitchell WJ, Tangney M. 2005. Carbohydrate uptake by the phosphotransferase system and other mechanisms. In Handbook on Clostridia, pp. 155–176. Edited by P. Dürre. Boca Raton, FL: CRC Press.

Miwa Y, Nakata A, Ogiwara A, Yamamoto M, Fujita Y. 2000. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **28**:1206-1210.

Miwa Y, Fujita Y. 2001. Involvement of two distinct catabolite-responsive elements in catabolite repression of the *Bacillus subtilis* myo-inositol (*ioI*) operon. *J. Bacteriol.* **183**:5877-5884.

Monedero V, Mazé A , Boël G, M. Zúñiga M, Beaufils S, Hartke A, Deutscher J. 2007. The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**:18-30.

Monod J. 1942. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Ph.D. thesis, University of Paris, Frankreich.

Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **3**:371-394.

Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R. 1982. Acetone und Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Appl. Env. Microbiol.* **44**:1318-1324.

Monot F, Engasser JM, Petitdemange H. 1984. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**:422-426.

Mortensen L, Dandanell G, Hammer K. 1989. Purification and characterization of the *deoR* repressor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**:325-331.

Münch R, Hiller K, Barg H, Heldt D, Linz S, Wingender E, Jahn D. 2003. PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res.* **31**:266-269.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**:255-262.

Ni Y, Wang Y, Sun Z. 2012. Butanol production from cane molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: batch and semicontinuous fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* **166**:1896-907.

Oelmüller U, Krüger N, Steinbüchel A, Friedrich C. 1990. Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Meth.* **11**:73-81.

Ounine K, Petitdemange H, Raval G, Gay R. 1983. Acetone-butanol production from pentoses by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* **5**:605-610.

- Ounine K, Petitdemange H, Raval G, Gay R.** 1985. Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1874-878.
- Paredes CJ, Alsaker KV, Papoutsakis ET.** 2005. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:969-978.
- Patni NJ, Alexander JK.** 1971. Catabolism of fructose and mannitol in *Clostridium thermocellum*: presence of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase, fructose 1-phosphate kinase, phosphoenolpyruvate:mannitol phosphotransferase, and mannitol 1-phosphate dehydrogenase in cell extracts. *J Bacteriol.* **105**:226-231.
- Plumbridge J, Vimr E.** 1999. Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneurameric acid by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:47-54.
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR.** 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:543-594.
- Qureshi N, Li XL, Hughes S, Saha BC, Cotta MA.** 2006. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Prog* **22**:673-680.
- Ramseier TM, Bledig S, Michotey V, Feghali R, Saier MH Jr.** 1995. The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **16**:1157-69.
- Ray WK, Larson TJ.** 2004. Application of AgaR repressor and dominant repressor variants for verification of a gene cluster involved in N-acetylgalactosamine metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **51**:813-826.
- Reid SJ.** 2005. Genetic organization and regulation of hexose and pentose utilization in the clostridia. In Handbook on Clostridia, pp. 133-153. Edited by P. Dürre. Boca Raton, FL: CRC Press.

Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, Stülke J, Karamata D, Saier MH, Hillen W. 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molecular Microbiology* **27**:1157-1169.

Ren C, Gu Y, Hu S, Wu Y, Wang P, Yang Y, Yang C, Yang S, Weihong J. 2010. Identification an inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering* **12**:446-454.

Ren C, Gu Y, Wu Y, Zhang W, Yang C, Yang S, Jiang W. 2012. Pleiotropic functions of catabolite control protein CcpA in Butanol-producing *Clostridium acetobutylicum*. *BMC Genomics* **13**:349.

Ren Q, Paulsen IT. 2005. Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Comput. Biol* **1**:e27.

Riebe O (2009) Enzyme und Reaktionswege zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.

Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS. 2001. Transcriptional regulation of pentose utilisation systems in the Bacillus/Clostridium group of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:305-314.

Rojo F. 1999. Repression of transcription initiation in bacteria. *J.Bacteriol* **181**:2987-2991.

van Rooijen RJ, Dechering KJ, Niek C, Wilmink J, de Vos WM. 1993. Lysines 72, 80 and 213 and aspartic acid 210 of the *Lactococcus lactis* LacR repressor are involved in the response to the inducer tagatose-6-phosphate leading to induction of lac operon expression. *Protein Engineering* **6**:201-206.

Roseman S, Meadow ND. 1990. Signal transduction by the bacterial phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* **265**:2993-2996.

- Saier MH Jr, Reizer J.** 1994. The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* **13**:755-764.
- Saier MH Jr, Ramseier TM.** 1996. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* **178**:3411-3417.
- Saier MH Jr.** 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.*, **3S**, 699-710.
- Saier MH Jr.** 2001. The Bacterial Phosphotransferase System: Structure, Function, Regulation and Evolution. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:325-327.
- Sambrook, J., Russell, D.W.** 2001. Molecular cloning: A laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- Scheel M.** 2012. Entwicklung und Anwendung eines Hochdurchsatz-Screenings zur Optimierung der biotechnologischen Butanolproduktion. Dissertation. Universität Rostock.
- Schulz, F.** 2013. Fluoreszenzproteine in *Clostridium acetobutylicum* - Ein neues *in vivo* Reportersystem. Dissertation. Universität Rostock.
- Schumacher MA, Sprehe M, Bartholomae M, Hillen W, Brennan RG.** 2010. Structures of carbon catabolite protein A-(HPr-Ser46-P) bound to diverse catabolite response element sites reveal the basis for high-affinity binding to degenerate DNA operators. *Nucleic Acids Res* **39**:2931-2942.
- Servinsky MD, Kiel JT, Dupuy NF, Sund CJ.** 2010. Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology* **156**:3478-3491.
- Servinsky MD, Germane KL, Liu S, Kiel JT, Clark AM, Shankar J, Sund CJ.** 2012. Arabinose is metabolized via a phosphoketolase pathway in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**:1859-1867.

- Shi Y, Li YX, Li YY.** 2010. Large number of phosphotransferase genes in the *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 genome and the study on their evolution. *BMC Bioinformatics* **11**:S9.
- Shine J, Dalgarno L.** 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**:1342-1346.
- Singh KD, Schmalisch MH, Stölke J, Görke B.** 2008. Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J Bacteriol* **190**:7275-7284.
- Sivagnanam K, Raghavan VGS, Shah M, Hettich RL, Verberkmoes NC., Lefsrud MG.** 2011. Comparative shotgun proteomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* from butanol fermentation using glucose and xylose. *Proteome Science* **9**:66.
- Soucaille P, Figge R, Croux C.** 2006. Process for chromosomal integration and DNA sequence replacement in Clostridia. Dépôt PCT n° PCT/EP2006/066997.
- Southern EM.** 1975. Detection of specific sequences among fragments separated by gelelectrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Stölke J, Hillen W.** 1998. Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* **85**:583-592.
- Stölke J, Hillen W.** 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**:195-201.
- Stölke J, Hillen W.** 2000. Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:849-80.
- Syed QA, Nadeem M, Nelofer R.** 2008. Enhanced butanol production by mutant strains of *Clostridium acetobutylicum* in molasses medium. *Turk J. Biochem.* **33**:25-30.

Tangney M, Mitchell WJ. 2000. Analysis of a catabolic operon for sucrose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**:71-80.

Tangney M, Galinier A, Deutscher J, Mitchell WJ. 2003. Analysis of the elements of Catabolite Repression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**:6-11.

Tangney M, Mitchell WJ. 2005. Regulation of Catabolic Gene Systems. In Handbook on Clostridia, pp. 583-605. Edited by P. Dürre. Boca Raton, FL: CRC Press.

Tangney M, Mitchell WJ. 2007. Characterisation of a glucose phosphotransferase system in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**:398-405.

Terracciano JS, Kashket ER. 1986. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **52**:86-91.

Thauer RK, Jungermann K, Decker K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews* **41**:100.

Titgemeyer F, Hillen W. 2002. Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**:59-71.

Tobisch S, Zühlke D, Bernhardt J, Stülke J, Hecker M. 1999. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:6996-7004.

Toyoda K, Teramoto H, Inui M, Yukawa H. 2008. Expression of the gapA gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum* is regulated by the global regulator SugR. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**:291-301.

- Toyoda K, Teramoto H, Inui M, Yukawa H.** 2009. Molecular mechanism of SugR-mediated sugar-dependent expression of the *ldhA* gene encoding L-lactate dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biot* **83**:315-327.
- Varga J, Stirewalt VL, Melville SB.** 2004. The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (*cpe*) regulation in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, **186**:5221-5229.
- Varga JJ, Therit B, Melville SB.** 2008. Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*, **76**:4944-4951.
- Voigt C.** 2010. Mutation von pSol-codierten Genen mit mutmaßlicher Bedeutung für das Wachstum von *Clostridium acetobutylicum* bei unterschiedlichen pH-Werten. Diplomarbeit. Universität Rostock.
- Voget CE, Mignone CF, Ertola RJ.** 1985. Butanol production from apple pomace. *Biotechnology Letters* **7**:43-46.
- Warner JB, Lolkema JS.** 2003. CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:475-490.
- Weickert MJ, Adhya S.** 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac Repressors. *J Biol Chem* **267**:15869-15874.
- Wiesenborn DP, Rudolph FB, Papoutsakis ET.** 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2717-2722.
- Wietzke M.** 2013. Der Redoxsensor Rex – Ein Transkriptionsregulator der Lösungsmittelbildung in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.

- Wietzke M, Bahl H.** 2012. The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**:749-761.
- Wilkins MR, Atiyeh H.** 2012. Fermentation. In Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing, pp. 185-204. Edited by Nurhan Turgut Dunford. Wiley-Blackwell.
- Wilkinson DL, Harrison RG.** 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **9**:443-8.
- Ye JJ, Saier MH Jr.** 1996. Regulation of sugar uptake via the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* is mediated by ATP-dependent phosphorylation of seryl residue 46 in HPr. *J. Bacteriol.* **178**:3557-3563.
- Yu Y, Tangney M, Aass HC, Mitchell WJ.** 2007. Analysis of the mechanism and regulation of lactose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1842-1850.

7. Anhang

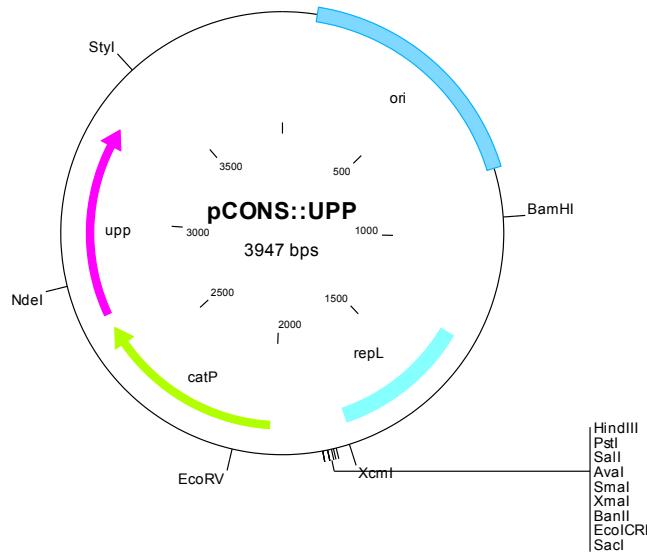


Abb. A.1: Vektorkarte von pCons::upp (Soucaille *et al.*, 2006). Dargestellt ist der Vektor pCons::upp. Hervorgehoben sind die Chloramphenicolresistenz-Kassette (hellgrün) der Replikationsursprung für Gram-negative (ori, dunkelblau) und Gram-positive Bakterien (repL, hellblau), sowie das upp-Gen (*cac2879*).

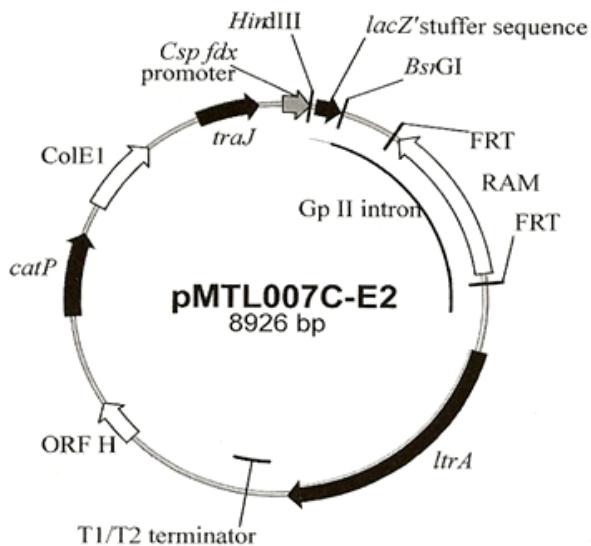


Abb. A.2: Vektorkarte von pMTL007C-E2 (Heap *et al.*, 2009). Das Plasmid zeichnet sich durch ein Gruppe II Intron aus, welches eine Erythromycinresistenz (ErmRAM) vermittelt. Zusätzlich werden auf der Vektorkarte die Lage des Gens für das LtrA-Protein (*ltrA*) und dem konstitutiven *fdx*-Promotor aus *C. sporogenes* dargestellt. Die Schnittstellen (HindIII und BsrGI) zum Einfügen der an das Zielgen angepassten 350-Bp-Intron-DNA befinden sich am 5' Ende des Gruppe II Introns. Dieser Vektor besitzt weiterhin eine Chloramphenicolresistenz (*catP*) und ein Replikon für Gram-negative Organismen (ColE1).

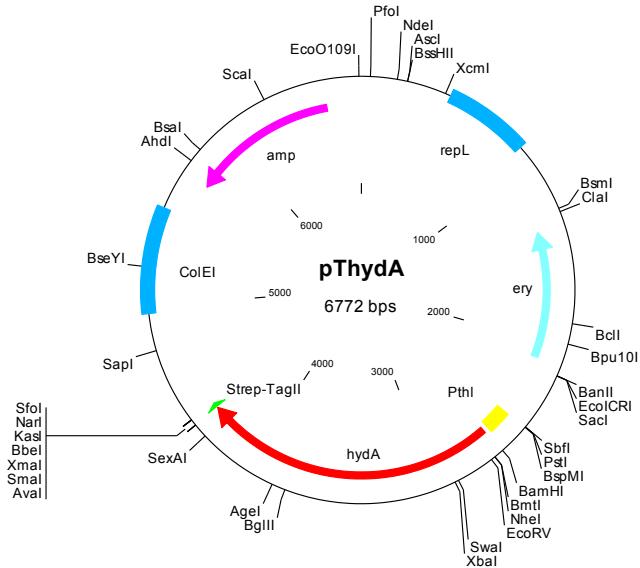


Abb. A.3: Plasmidkarte von pThyda. Dargestellt ist der Vektor pThyda. Farblich hervorgehoben sind die Ampicillin- (lila) sowie die Erythromycinresistenz (hellblau), der *thl*-Promotor (gelb), das *hydA*-Gen (rot), welches spezifisch ausgetauscht wurde und der C-terminale „Strep-tagII“ (grün). Der Vektor besitzt einen Replikationsursprung sowohl für *E. coli* (ColE1, blau) als auch Gram-positive (repL, blau) Bakterien.

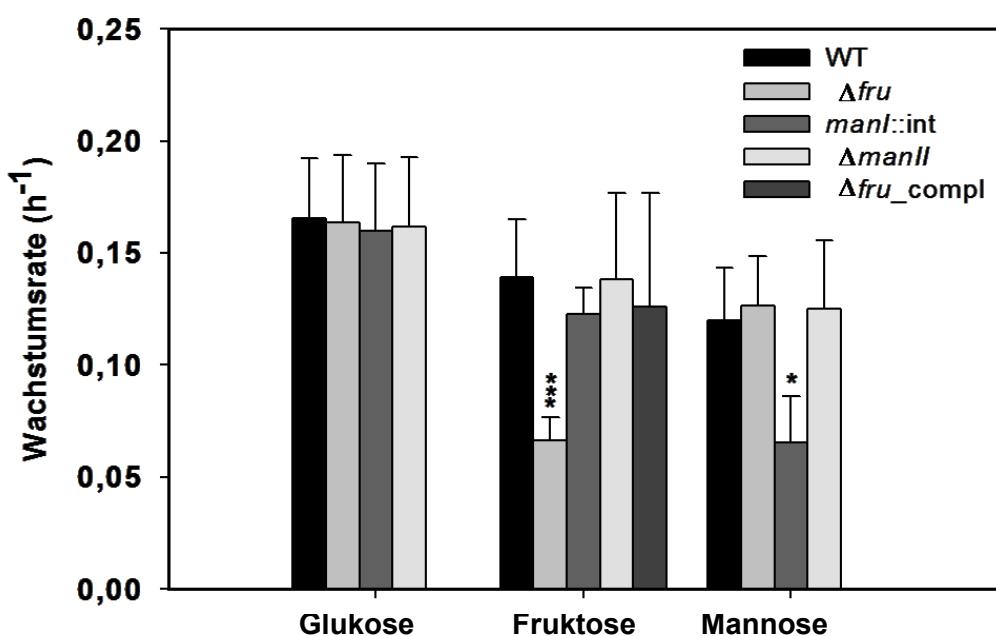


Abb. A.4: Wachstumsraten von *C. acetobutylicum*-Stämmen auf Glukose, Fruktose und Mannose. Die einzelnen Balken repräsentieren die Mittelwerte ($n \geq 5$) der Wachstumsraten (h^{-1}) des *C. acetobutylicum* Wildtyp und der drei Defektmutanten von PTS^{Fru} (Δfru), PTS^{ManI} ($manI::int$) und PTS^{ManII} ($\Delta manII$), sowie des Δfru -Komplementationsstammes (Δfru_compl). Das Wachstum erfolgte in MS-MES mit Glukose, Fruktose oder Mannose als einziger C-Quelle. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz α wurde mit dem Student *t*-Test (ungepaart) berechnet und wurde als *p*-Wert angegeben: * $p < 0,05$ (geringfügig signifikant), ** $p < 0,01$ (sehr signifikant), *** $p < 0,001$ (hoch signifikant).

Tab. A.1: Vergleich der wachstumsphysiologischen Parameter der statischen Kulturen mit den drei C-Quellen Glukose, Fruktose und Mannose verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme

Parameter	WT	Δfru	<i>manI::int</i>	<i>Δ manII</i>
Wachstumsrate (h^{-1})				
μ_{Glu}	0.166	0.164	0.160	0.162
μ_{Fru}	0.139	0.067***	0.123	0.138
μ_{Man}	0.120	0.126	0.066*	0.125
Maximale OD₆₀₀				
Glu	6.48	6.30	5.80	6.56
Fru	6.66	3.08	5.60	6.60
Man	3.65	3.80	3.67	5.38
Verbrauch der Kohlenstoffquelle (g l⁻¹)				
c _{Glu}	54.0	53.8	51.7	57.2
c _{Fru}	46.3	4.8	47.8	50.3
c _{Man}	42.1	28.2	49.4	26.0
Fermentation Produkte (g l⁻¹)^a				
Glukose				
Acetat	0.23	0.17	1.80	0.64
Butyrat	0.63	0.26	0.20	0.00
Aceton	4.08	2.79	2.89	4.94
Butanol	7.69	5.27	4.99	8.42
Ethanol	0.55	0.39	0.36	1.24
Fruktose				
Acetat	0.23	1.90**	0.34	0.41
Butyrat	0.02	1.68**	0.17	0.15*
Aceton	1.35	0.18**	1.55	2.49*
Butanol	2.91	0.00***	3.68	6.00*
Ethanol	0.58	0.15**	0.62	1.46
Mannose				
Acetat	1.12	2.82**	0.92	1.06
Butyrat	0.85	2.66**	0.37	0.88
Aceton	0.64	0.37	1.47*	1.69
Butanol	1.24	0.63	3.35***	4.08
Ethanol	0.17	0.31	0.58***	1.06

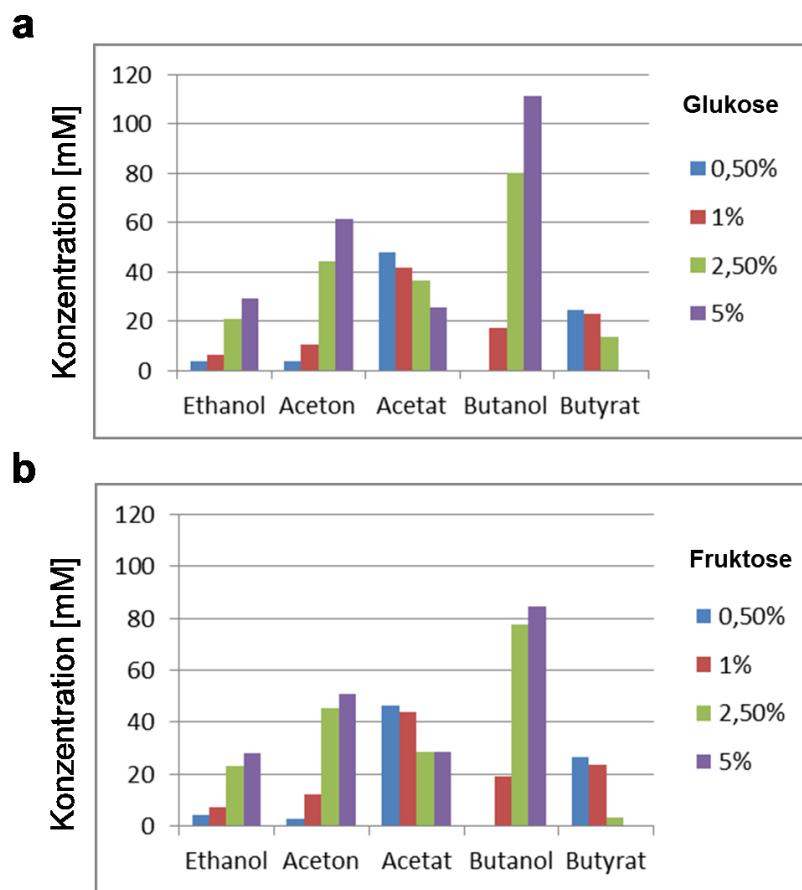


Abb. A.5: Fermentationsendprodukte von *C. acetobutylicum* Wildtyp während des Wachstums mit Glukose bzw. Fruktose als C-Quelle. Die verschiedenen Farben der Balken repräsentieren die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen (0,5 %; 1,0 %; 2,5 %; 5 %) der Substrate Glukose (a) und Fruktose (b) für den Wildtyp von *C. acetobutylicum*. Nach 156 h Wachstum wurden Proben entnommen und das Produktspektrum gaschromatographisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Replikaten.

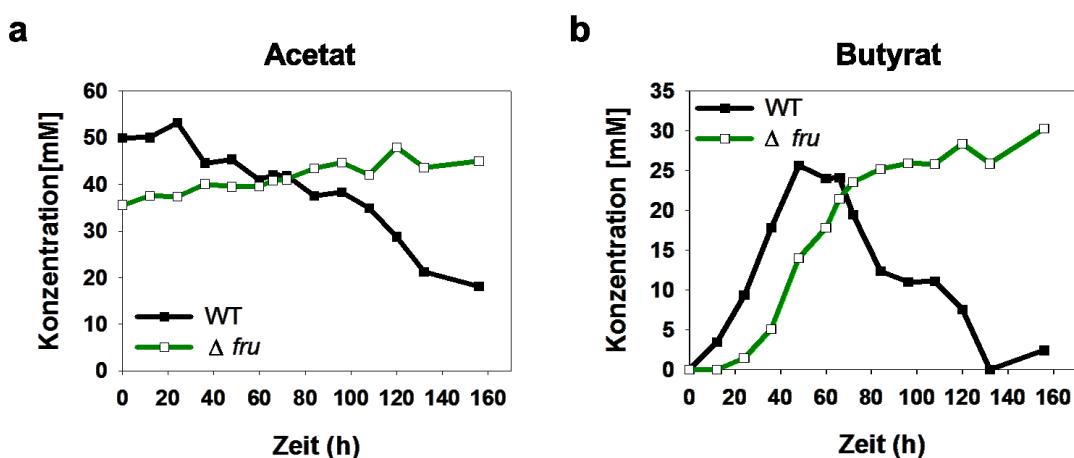


Abb. A.6: Verlauf der Säureproduktion von *C. acetobutylicum* Wildtyp und Δ fru während des Wachstums mit Fruktose als Substrat. Zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums wurden Proben entnommen und die gebildeten Mengen an Acetat (a) und Butyrat (b) gaschromatographisch bestimmt.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich recht herzlich bei **Prof. Dr. Hubert Bahl** für die Ermöglichung der selbständigen Anfertigung dieser Arbeit bedanken, sowie für alle Freiheiten, die er mir bei der Bearbeitung dieses Themas gelassen hat.

Im Besonderen möchte ich **Dr. Ralf-Jörg Fischer** danken für seine wissenschaftliche Betreuung und Anleitung während der letzten Jahre, seine konstruktive Kritik bei der Fertigstellung dieser Arbeit, sowie für die Durchsicht dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie, die mich während meiner Arbeit begleitet haben. Insbesondere möchte ich mich bei **Ilona Boldt, Hella Goschke, Regina Karstädt** und **Monika Timm** für die Hilfe bei der Bewältigung der kleinen und großen Probleme im Laboralltag bedanken. Bei **Markus Klipp, Dr. Dörte Lehmann, Dr. Tina Lütke-Eversloh, Dr. Miriam Mann, Benedikt Möllers, Dr. Antje May, Dr. Oliver Riebe, Dr. Michael Scheel, Dr. Franziska Schulz, Delyana Vasileva** und **Dr. Mandy Wietzke** bedanke ich mich für die außerordentlich schöne Zeit im Labor und im Büro, sowie die zahlreichen Hilfestellungen und guten Ratschläge.

Ein spezieller Dank gebührt **Dr. Holger Janssen**, der mich besonders zu Beginn der Promotion nach Rückschlägen immer wieder aufgebaut hat und stets Interesse am Fortgang dieser Arbeit aufgebracht hat. Außerdem danke ich ihm für die Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Henrique Machado, Ronny Uhlig, Daniela Wetzel** und **Katja Zimmermann** für die gemeinsame „Berg- und Talfahrt im Dienste der Wissenschaft“ und die vielen lustigen Momente auch über die Labor-Grenzen hinaus bedanken. Dank Euch habe ich nie den Spaß an der Arbeit verloren.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden/Innen, allen voran meinen Eltern **Sabine Lindemann** und **Dr. Christian Voigt**, sowie **Steffen, Susi, Munir, Cleo** und **Mathias**. Ihr habt mich immer bedingungslos unterstützt und mich stets an die wirklich wichtigen Dinge im Leben erinnert. Danke!

Abschließend sei allen gedankt, die ich vergessen habe zu erwähnen und die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Selbständigkeitserklärung

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

Rostock, 28.01.2014

Christine Voigt