

**Fluoreszenzproteine in *Clostridium acetobutylicum* -
Ein neues *in vivo* Reportersystem**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Institut für Biowissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2013

vorgelegt von:

Franziska Schulz

aus Rostock

geboren am 25.04.1985 in Crivitz

Gutachter:

Prof. Dr. Hubert Bahl

Universität Rostock

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer

Universität Rostock

Medizinische Fakultät

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Einreichung der Dissertation: 25. Januar 2013

Wissenschaftliches Kolloquium: 19. April 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. <i>Clostridium acetobutylicum</i>	1
1.2. Molekularbiologische Methoden für Clostridien	3
1.3. Ein neues Fluoreszenz-basiertes Reportersystem für Anaerobier	5
1.4. Zielstellung	7
2. Material und Methoden	9
2.1. Organismen und Plasmide	9
2.2. Oligonukleotide	16
2.3. Nährmedien	18
2.3.1. Medium zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	18
2.3.2. Medien zur Anzucht von <i>Clostridium acetobutylicum</i>	18
2.3.3. Medienzusätze	20
2.4. Stammhaltung	21
2.5. Batch-Kulturen	21
2.6. Anzucht von <i>C. acetobutylicum</i> auf Festmedien	22
2.7. Bestimmung physiologischer Parameter	22
2.7.1. Messung der Optischen Dichte	22
2.7.2. Bestimmung des pH-Werts	22
2.7.3. Lichtmikroskopie	23
2.7.4. Fluoreszenzmikroskopie	23
2.7.5. Gaschromatographie	23
2.7.5.1. Probenvorbereitung	23
2.7.5.2. Quantifizierung	24

2.7.5.3. Analysebedingungen	24
2.8. Arbeiten mit Nukleinsäuren	24
2.8.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	24
2.8.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.8.3. Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	26
2.8.4. Enzymatische Modifikationen von DNA	29
2.8.4.1. Restriktion von DNA	29
2.8.4.2. Dephosphorylierung von DNA	30
2.8.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.8.5. Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	31
2.8.5.1. Isopropanolfällung	31
2.8.5.2. Aufreinigung mittels GeneClean® Turbo Kit	31
2.8.5.3. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	31
2.8.6. Agarosegelelektrophorese	32
2.8.7. <i>In vitro</i> -Amplifikation von DNA mittels PCR	32
2.8.7.1. Primerdesign	33
2.8.7.2. Standard-PCR-Reaktionsbedingungen	33
2.8.7.3. Ortsspezifische Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i>)	34
2.9. Erzeugung rekombinanter Mikroorganismen	34
2.9.1. Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.9.2. Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.9.3. CaCl ₂ -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i>	36
2.9.4. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	37
2.9.5. Transformation von <i>C. acetobutylicum</i> mittels Elektroporation	37
2.10. Arbeiten mit Proteinen	39
2.10.1. Zellanzucht und Zellaufschluss mittels Ultraschall	39
2.10.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	39
2.10.3. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
2.10.4. Coomassie-Färbung	42
2.10.5. Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	42

2.10.6. Doppelimmunpräzipitation und Detektion	43
2.11. Fluoreszenzmessungen	44
2.11.1. Probenvorbereitung	44
2.11.2. Messparameter	45
2.12. Bezugsquellen	46
3. Experimente und Ergebnisse	48
3.1. Etablierung eines FbFP-basierten Reportersystems	48
3.1.1. Klonierung und heterologe Expression von FbFPs in <i>E. coli</i>	49
3.1.1.1. Konstruktion von FbFP-kodierenden Shuttle-Vektoren in <i>E. coli</i>	49
3.1.1.2. Phänotypische Charakterisierung FbFP-exprimierender <i>E. coli</i> -Stämme.....	51
3.1.2. Heterologe Expression von FbFPs in <i>C. acetobutylicum</i>	52
3.1.2.1. Proteinnachweis mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	53
3.1.2.2. Phänotypische Charakterisierung FbFP-exprimierender <i>C. acetobutylicum</i> -Stämme	54
3.1.3. Wachstumsphysiologische Fluoreszenz-Optimierung	56
3.1.3.1. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die FbFP-Expression rekombinanter <i>C. acetobutylicum</i> -Stämme	56
3.1.3.2. Temperatureinfluss auf die Fluoreszenz von FbFPs in <i>C. acetobutylicum</i>	57
3.1.4. Molekulare Fluoreszenz-Optimierung durch gezielten Aminosäure- austausch.....	58
3.1.4.1. Klonierung und heterologe Expression von Pp3 in <i>E. coli</i>	59
3.1.4.2. Heterologe Expression von Pp3 in <i>C. acetobutylicum</i>	60
3.1.5. Vergleich geeigneter Plasmidserien	61
3.1.5.1. pMTL80000-Serie.....	61
3.1.5.2. pT-Vektor bzw. pTC-Vektor	62

3.2. Promotorstudien der <i>thlA</i> -, <i>ptb</i> -, <i>adc</i> - und <i>hydA</i> -Gene zur Charakterisierung des Reportersystems	63
3.2.1. Klonierung der clostridiellen Promotoren und Expression in <i>E. coli</i>	63
3.2.1.1. Konstruktion von Vektoren zur Expression von Pp2 durch verschiedene clostridielle Promotoren.....	64
3.2.1.2. Promotor-spezifische Pp2-Expression in <i>E. coli</i>	65
3.2.2. Aktivitätsbestimmungen der Promotoren in <i>C. acetobutylicum</i>	66
3.2.2.1. Promotor-spezifische Pp2-Expression in <i>C. acetobutylicum</i>	66
3.2.2.2. Wachstumsabhängige Aktivität der Promotoren in <i>C. acetobutylicum</i>	67
3.2.2.3. Kolonie- und Zellmorphologische Charakterisierung der Promotor-spezifischen Pp2-Expression in <i>C. acetobutylicum</i>	68
3.3. Expressionsanalysen des <i>adhE2</i> -Promotors in verschiedenen <i>C. acetobutylicum</i> -Stämmen.....	70
3.3.1. Klonierung des clostridiellen <i>adhE2</i> -Promotors.....	71
3.3.1.1. Konstruktion von pTC:: <i>P(adhE2)pp2</i> zur <i>adhE2</i> -Promotor-kontrollierten Pp2-Expression.....	71
3.3.1.2. <i>adhE2</i> -Promotor-vermittelte Pp2-Expression in <i>E. coli</i>	73
3.3.2. Aktivitätsbestimmungen des <i>adhE2</i> -Promotors in <i>C. acetobutylicum rex</i> ::int(95), <i>ptb</i> ::int(87) und <i>hbd</i> ::int(69) im Vergleich zum Wildtyp	74
3.3.2.1. <i>adhE2</i> -Promotor-vermittelte Pp2-Expression im Wildtyp von <i>C. acetobutylicum</i> und verschiedenen Integrationsstämmen	74
3.3.2.2. Wachstumsabhängige Aktivität des <i>adhE2</i> -Promotors im Wildtyp von <i>C. acetobutylicum</i> und verschiedenen Integrationsstämmen	76
3.4. Entwicklung eines induzierbaren Expressionssystems	79
3.4.1. Klonierung des <i>fac</i> -Promotors und des <i>lacI</i> -Repressors	80
3.4.1.1. Konstruktion des pTi-Plasmids als induzierbares System.....	80
3.4.1.2. Funktionsnachweis des induzierbaren Systems in <i>E. coli</i>	81
3.4.2. Charakterisierung des induzierbaren Systems in <i>C. acetobutylicum</i>	82

3.4.2.1. Funktionsnachweis des induzierbaren Systems in <i>C. acetobutylicum</i> ...	83
3.4.2.2. IPTG-vermittelte Induktion in <i>C. acetobutylicum</i>	84
3.5. Entwicklung eines Fluoreszenz-Hochdurchsatz-Screenings für <i>C. acetobutylicum</i>	85
3.5.1. Anzucht von <i>C. acetobutylicum</i> in Mikrokulturen.....	85
3.5.2. Fluoreszenzmessungen in Mikrotiterplatten	86
3.5.3. Differenzierung rekombinanter <i>C. acetobutylicum</i> -Stämme mittels Fluoreszenz-HTS	88
4. Diskussion	90
4.1. Etablierung eines FbFP-basierten Reportersystems	90
4.1.1. Fluoreszenz-Optimierungen	92
4.1.2. Gegenüberstellung geeigneter Plasmidserien	94
4.2. Anwendung des FbFP-basierten Reportersystems	95
4.2.1. Promotorstudien in <i>C. acetobutylicum</i>	95
4.2.2. Promotorstudien in <i>C. acetobutylicum</i> -Integrationsstämmen	101
4.2.3. Ein induzierbares Expressionssystem für <i>C. acetobutylicum</i>	109
4.2.4. Das Fluoreszenz-Hochdurchsatz-Screening	112
4.3. Ausblick	114
5. Zusammenfassung	116
6. Literaturverzeichnis	118
7. Anhang	130
Danksagung	140
Selbständigkeitserklärung	141

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin; Amper
A.	Aqua, <i>Aequorea</i>
Abb.	Abbildung
ABE	Aceton-Butanol-Ethanol
<i>ad</i>	auffüllen auf
Adc	Acetoacetat-Decarboxylase
AdhE	Aldehyd/ Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosin-5-Diphosphat
Ala	Alanin
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5-Triphosphat
B.	<i>Bacillus</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
Bdh	Butanol-Dehydrogenase
Bp	Basenpaar(e)
BsFbFP	<i>B. subtilis</i> (FMN)-basiertes Fluoreszenzprotein
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti
C	Kohlenstoff; Cytosin
C-	Carboxy-
C.	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CatP	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CGM	<i>clostridial growth medium</i>
Cm	Chloramphenicol

CO	Kohlenmonoxid
CoA	Coenzym A
CO ₂	Kohlendioxid
Cys	Cystein
Da	Dalton
<i>dest.</i>	destilliert
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythriol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EgIA	β-1,4-Endoglukanase
E _m	<i>emission</i> (Emissionswellenlänge)
Em	Erythromycin
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
E _x	<i>excitation</i> (Anregungswellenlänge)
F	Farad
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FbFP	(FMN)-basiertes Fluoreszenzprotein
Fe	Eisen
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
fw	<i>forward</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein

Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GusA	β -Glukuronidase
h	Stunde
H ₂	Wasserstoff
Hbd	3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase
HTS	<i>high-throughput screening</i> (Screening im Hochdurchsatz)
HydA	Hydrogenase
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
k	Kilo
l	Liter, Länge
LacZ	β -Galaktosidase
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung(en)
LucB	Luziferase (aus <i>Photinus pyralis</i>)
LOV	<i>light oxygen voltage</i>
LuxA/LuxB	Luziferase (aus <i>Photobacterium luminescens</i>)
m	Meter; milli (10 ⁻³)
M	Molar
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
min	Minute
mod.	modifiziert
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MS	Massenspektrometrie; <i>medium synthetique</i>
μ	mikro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹); Menge
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCIMB	<i>The National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria</i>

NEB	<i>New England Biolabs</i>
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
p	piko (10 ⁻¹²)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PABA	Paraaminobenzoessäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Phe	Phenylalanin
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
PpFbFP	<i>P. putida</i> (FMN)-basiertes Fluoreszenzprotein
Pta	Phosphotransacetylase
Ptb	Phosphotransbutyrylase
RCA	<i>reinforced clostridial agar</i>
Rex	putatives <i>redox-active protein</i>
RFU	<i>relative fluorescent units</i> (Relative Fluoreszenzeinheiten)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
s	Sekunde
SAP	Shrimps Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt(e)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
Tc	Tetracyclin

TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Thl	Thiolase
Tm	Thiamphenicol
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
TYG	<i>tryptone yeast extract (glucose)</i>
Tyr	Tyrosin
U	Unit
u. a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
V	Volt
v. a.	vor allem
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
YFP	Yellow Fluorescent Protein
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. *Clostridium acetobutylicum*

Im Jahr 1912 isolierte der Biochemiker Chaim Weizmann einen Bakterienstamm, der in der Lage war, Stärke fermentativ zu Butanol und Aceton umzusetzen (Nölling *et al.*, 2001). Erst 14 Jahre später erhielt dieser Stamm seinen bis heute gültigen Namen *Clostridium acetobutylicum*. Im Laufe der 100-jährigen Geschichte dieses Mikroorganismus' war v. a. die so genannte Aceton-Butanol-Ethanol (ABE)-Fermentation von wirtschaftlichem Interesse. So stellte sie innerhalb des Ersten Weltkrieges eine entscheidende Quelle für Aceton dar, das bei der Erzeugung von Schießpulver essentiell war (Woods, 1995). In den folgenden Jahren wurde Butanol, das eigentliche Hauptprodukt der ABE-Fermentation, als Lösungsmittel z. B. für die Produktion von Butylacetat-basierten Lacken in der wachsenden Automobilindustrie verwendet (Jones & Woods, 1986). Aufgrund wirtschaftlicherer Erdöl-basierter Verfahren zur Produktion von Aceton und Butanol erfolgte die Einstellung des industriellen ABE-Prozesses nach dem Zweiten Weltkrieg in den Industrieländern (Nölling *et al.*, 2001). Infolge der Ölkrise in den 1970er Jahren und insbesondere in der heutigen Zeit hat das internationale Interesse an Biokraftstoffen auch in der Öffentlichkeit stark zugenommen (Dürre, 2008). Dabei ist Butanol zum einen ein wichtiger Rohstoff für die chemische Industrie und kann zum anderen als Flüssigkraftstoff verwendet werden. Bis heute stellt die ABE-Fermentation durch *C. acetobutylicum* und anderen solventogenen Clostridien das zweitgrößte biotechnologische Produktionsverfahren dar und bietet ein enormes Potential für die Nutzung nachwachsender Rohstoffe (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011).

Das Gram-positive, strikt anaerob lebende Bakterium *C. acetobutylicum* gilt als Modellorganismus für die apathogenen Clostridien (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Es zeichnet sich durch seinen einzigartigen biphasischen Fermentationsmetabolismus aus (Abb. 1.1), bei dem während des exponentiellen Wachstums die Kohlenstoffquelle, wie z. B. Glukose oder Fruktose zu den Säuren Acetat und Butyrat umgesetzt wird (Jones & Woods, 1986). Mit Beginn der stationären Wachstumsphase erfolgt die Umstellung des Stoffwechsels und es werden vorwiegend die Lösungsmittel Aceton, Butanol und

Ethanol gebildet, die u. a. aus der Reassimilation der Säuren hervorgehen. Der Wandel des Stoffwechsels von der Acidogenese (Säurephase) hin zur Solventogenese (Lösungsmittelphase) ist ebenfalls anhand eines Anstiegs des pH-Wertes des Kultivierungsmediums ersichtlich (Jones & Woods, 1986).

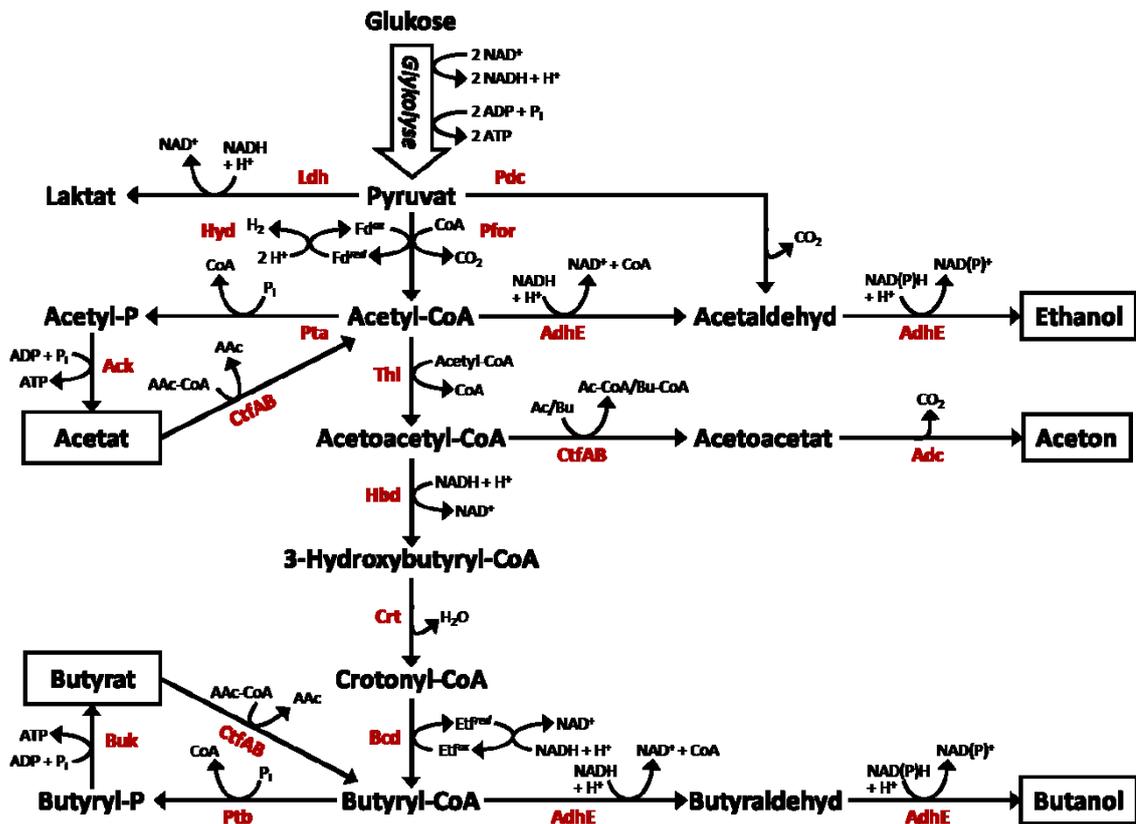


Abb. 1.1: Fermentationsmetabolismus von *C. acetobutylicum* (modif. nach Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Dargestellt sind die für die Bildung der Säuren und Lösungsmittel essentiellen Stoffwechselreaktionen. In rot hervorgehobene Buchstaben symbolisieren die involvierten Enzyme. Ldh, Lactat-Dehydrogenase; Pdc, Pyruvat-Decarboxylase; Hyd, Hydrogenase; Pfor; Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; Fd, Ferredoxin; Pta, Phosphotransacetylase; Ack, Acetat-Kinase; AdhE, Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase; CtfAB, Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase; Adc, Acetoacetat-Decarboxylase; Thl, Thiolase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Crt, Crotonase; Bcd, Butyryl-CoA-Dehydrogenase; Etf, Elektronen-Transfer-Flavoprotein; Ptb, Phosphotransbutyrylase; Buk, Butyrat-Kinase. AAC, Acetoacetat; AAC-CoA, Acetoacetyl-CoA; Ac/Bu, Acetat/Butyrat; Ac-CoA/Bu-CoA, Acetyl-CoA/Butyryl-CoA; ox, oxidiert; red, reduziert.

Der namensgebende Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* geht zudem mit morphologischen Änderungen der Zellen einher (Jones & Woods, 1986). Mit dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase nehmen die stäbchenförmigen Zellen eine zigarrenartige Gestalt an und bilden als intrazellulären Speicherstoff Granulose-Einschlüsse, die lichtmikroskopisch gut erkennbar und für den sog. *clostridial stage*-Zelltyp charakteris-

tisch sind. Während der Umstellung des Stoffwechsels auf die Aceton- und Butanol-Produktion wird ebenfalls die Sporulation initiiert. Es entstehen Vorsporen, die zu Endosporen heranreifen und nach ihrer Freisetzung u. U. mehrere Jahre ungünstige Umweltbedingungen überdauern (Jones *et al.*, 2008). Die genauen Signale, die zum Beginn des Sporulationsprozesses führen, sind bisher weitestgehend unbekannt.

1.2. Molekularbiologische Methoden für Clostridien

Die grundlegenden genetischen und physiologischen Regulationsmechanismen in *C. acetobutylicum*, wie z. B. die Umstellung des Stoffwechsels von der Säure- auf die Lösungsmittelbildung und auch die Initiation der Sporulation, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Ursächlich ist hierbei die lange Zeit der genetischen Unzugänglichkeit dieser Bakterien, weshalb vergleichsweise wenige Analysen auf molekularer Ebene erfolgten. Im Gegensatz zu typischen mikrobiologischen Modellorganismen, wie z. B. *Escherichia coli* sind nur wenige Expressionsvektoren, Selektionsmarker und effiziente Transformationsprotokolle für *C. acetobutylicum* und andere Clostridien verfügbar.

Erst seit kurzem sind gezielte Manipulationen durchführbar. Das Genom von *C. acetobutylicum* wurde 2001 publiziert (Nölling *et al.*, 2001), gefolgt von einigen Transkriptomanalysen (Tomas *et al.*, 2003; Alsaker & Papoutsakis, 2005; Paredes *et al.*, 2007). Eine zuverlässige Technik zur gezielten Geninaktivierung konnte erst 2007 etabliert werden (Heap *et al.*, 2007) und gilt als wichtiger Meilenstein auf dem Gebiet der clostridiellen Genetik. Zurzeit werden diese Methoden verwendet, um durch rationales *Metabolic Engineering* rekombinante Stämme zu erzeugen, die beispielsweise eine verminderte Nebenproduktbildung oder eine verbesserte Butanol-Toleranz aufweisen (Lehmann *et al.*, 2012a; 2012b; Cooksley *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012). Um Ansatzpunkte für die genetische Stammoptimierung zu finden, ist das wissenschaftliche Verständnis der stoffwechselphysiologischen Regulationsmechanismen essentiell. Durch entsprechende Kenntnisse können gezielte molekularbiologische Strategien umgesetzt und so die Butanol-Produktion durch *C. acetobutylicum* nachhaltig gesteigert werden. In Tab. 1.1 sind die derzeit etablierten biotechnologischen Methoden

zur Aufklärung der regulatorischen Mechanismen von *C. acetobutylicum* zusammengefasst.

Tab. 1.1: Übersicht molekularbiologischer Techniken für *C. acetobutylicum*. *allele-coupled exchange* (ACE), β -Galaktosidasegen (*lacZ*), β -Glukuronidasegen (*gusA*), Chloramphenicol-Acetyltransferasegen (*catP*), Luziferasegen (*lucB*), 2 *dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (2D-SDS-PAGE), *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF/MS).

Ziel	Methode	Referenz
Gentransfer	Elektrotransformation Shuttle-Vektoren Methylierung von Plasmid-DNA	Oultram <i>et al.</i> , 1988 Truffaut & Reyssset, 1989 Mermelstein & Papoutsakis, 1993
Überexpression von Genen	Plasmid-kodiert	Mermelstein <i>et al.</i> , 1992
Reduktion von Genaktivitäten	Antisense-RNA	Desai & Papoutsakis, 1999
Geninaktivierung	Integrative Plasmide Gruppe-II-Intron, Clostron® Gruppe-II-Intron, Targetron <i>double-crossover</i> , ACE <i>double-crossover</i>	Green & Bennett, 1996 Heap <i>et al.</i> , 2007; 2010 Shao <i>et al.</i> , 2007 Heap <i>et al.</i> , 2012 Al-Hinai <i>et al.</i> , 2012
Promotoranalysen	<i>lacZ</i> -Reporter <i>gusA</i> -Reporter <i>catP</i> -Reporter <i>lacZ</i> - und <i>lucB</i> -Reporter	Tummala <i>et al.</i> , 1999 Girbal <i>et al.</i> , 2003 Scotcher <i>et al.</i> , 2003 Feustel <i>et al.</i> , 2004
Transkriptomanalysen	Microarray	Tomas <i>et al.</i> , 2003
Proteomanalysen	2D-SDS-PAGE 2D-SDS-PAGE, MALDI-TOF/MS	Schaffer <i>et al.</i> , 2002 Sullivan & Bennett, 2006
Genombibliothek	gescherte chromosomale DNA-Fragmente, Plasmid-kodiert	Borden & Papoutsakis, 2007

Erkenntnisse über Promotor-Stärken, -Regulationen und -Aktivitätsprofile während des mikrobiellen Wachstums sind ebenfalls grundlegend für die Generierung von effektiven clostridiellen Expressionsvektoren und darauf aufbauenden *Metabolic Engineering*-Strategien. Hierfür kann der Einsatz von Reporter genen, die als wichtige gentechnische Werkzeuge für die Visualisierung von Genexpressionsmustern fungieren

und so spezifische Messungen von Genaktivitäten erlauben, hilfreich sein. Bisher etablierte Reportersysteme für Clostridien beruhen dabei auf Messungen von Enzymaktivitäten (CatP, LacZ, GusA, EglA) in Zellextrakten (Matsushita *et al.*, 1994; Bullifent *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 2000; Ravagnani *et al.*, 2000; Quixley & Reid, 2000) oder auf einem Luziferase-basierten Assay (Phillips-Jones, 1993; Phillips-Jones, 2000; Davis *et al.*, 2000). Ein für *C. acetobutylicum* entwickeltes β -Galaktosidase (LacZ)-Reportersystem wurde insbesondere zur Analyse der Phosphotransbutyrylasegen (*ptb*-), der Thiolasegen (*thlA*-) und der Acetoacetat-Decarboxylasegen (*adc*-) Promotoren verwendet (Tummala *et al.*, 1999). Die ermittelten Aktivitätsunterschiede der β -Galaktosidase bestätigten die Funktionalität des Reportersystems zur signifikanten Differenzierung der verschiedenen Promotoren. Thormann *et al.* (2002) nutzten dieses Reportersystem ebenfalls zur Charakterisierung der regulatorischen Promotorregionen des *sol*-Operons (kodiert die Butyraldehyd/Butanol-Dehydrogenase und Coenzym A-Transferase). Auch die β -Glukuronidase (GusA) konnte als Reporterprotein in *C. acetobutylicum* für die Untersuchung der *thlA*-, *adc*-, *ptb*- und Hydrogenasegen (*hydA*-) Promotoren genutzt werden (Girbal *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde ein Chloramphenicol-Acetyltransferase (CatP)-Reportersystem für die Charakterisierung des *C. acetobutylicum* Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenasegen (*adhE*-) Promotors etabliert (Scotcher *et al.*, 2003). Zudem erfolgte die Analyse des *ptb*- und *sol*-Promotors unter Verwendung eines Luziferase-Reporters (LucB), wobei jedoch eine starke Durchmischung der zu messenden Proben mit Sauerstoff die Abtötung der strikt anaeroben Clostridien zur Folge hatte (Feustel *et al.*, 2004). Insgesamt konnten folglich einige Reporter-Beispiele für *C. acetobutylicum* beschrieben werden. Da diese allerdings auf Messungen von Enzymaktivitäten in Zelllysaten beruhen oder Sauerstoff-abhängig sind, können sie lediglich als *ex vivo*-Techniken angesehen werden.

1.3. Ein neues Fluoreszenz-basiertes Reportersystem für Anaerobier

Weit verbreitete *in vivo* Reportersysteme basieren auf der Verwendung von Fluoreszenzproteinen, wie z. B. dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) und dessen Derivaten (Shimomura *et al.*, 1962; Matz *et al.*, 1999). Mit Hilfe dieser Reporterproteine

gelang es, diverse Mikroorganismen z. B. hinsichtlich ihrer Genexpression und der Lokalisation von spezifischen Proteinen zu untersuchen (Southward & Surette, 2002). Aufgrund der zwingenden Anwesenheit von molekularem Sauerstoff für die autokatalytische Synthese des GFP-Chromophors (Tsien, 1998) ist die Anwendung dieser Fluoreszenzproteine in Clostridien und anderen anaeroben Organismen jedoch ausgeschlossen. Daher wäre ein Reportersystem, welches keinen Sauerstoff benötigt und die Zellen nicht zerstört eine hilfreiche Methode für die *in vivo*-Charakterisierung von Regulationsmechanismen dieser Bakterien.

Vor kurzem wurden Flavinmononukleotid (FMN)-basierte Fluoreszenzproteine (FbFPs), die auch in Abwesenheit von Sauerstoff für *in vivo*-Messungen genutzt werden können, für die Anwendung als neue Reporterproteine entwickelt (Drepper *et al.*, 2007a). Grundlage für dieses Reportersystem waren die Blaulichtrezeptoren YtvA aus *Bacillus subtilis* und SB2 aus *Pseudomonas putida*, die charakteristischerweise eine LOV (*Light Oxygen Voltage*)-Domäne besitzen. Diese enthält ein hochkonserviertes Sequenzmotiv mit einem photoaktiven Cystein (Gly⁵⁹-Xaa⁶⁰-Asn⁶¹-Cys⁶²-Arg⁶³-Phe⁶⁴-Leu⁶⁵-Gln⁶⁶), das essentiell für den Photozyklus ist.

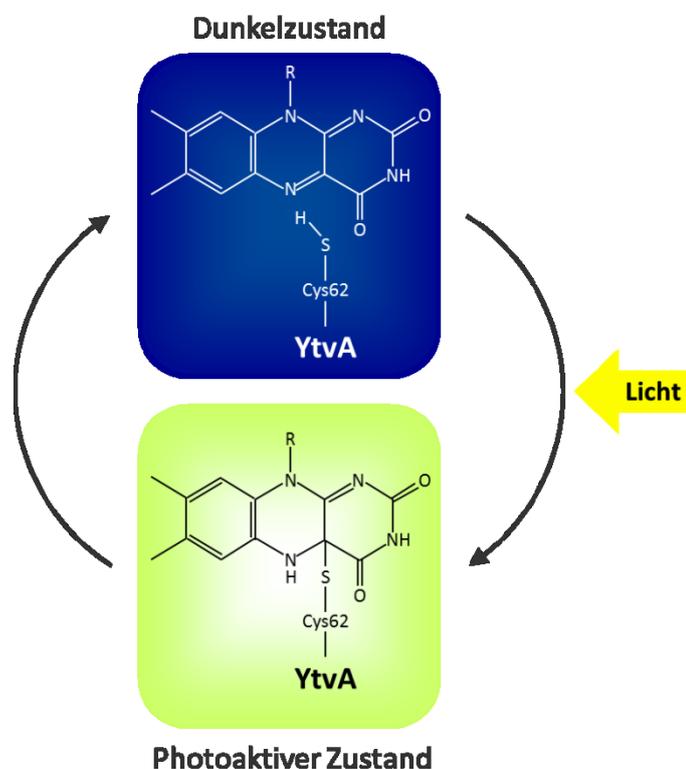


Abb. 1.2: Photozyklus der YtvA-LOV-Domäne aus *B. subtilis* (Drepper *et al.*, 2007b).

In Abb. 1.2 ist der Photozyklus des YtvA-Proteins aus *B. subtilis* dargestellt. Im Dunkelzustand ist das FMN lose mit der LOV-Domäne assoziiert. Nach Anregung des Proteins mit Blaulicht (450 nm) wird das FMN als Chromophor gebunden, sodass innerhalb dieser transienten, kovalenten Bindung ein FMN-Cystein C(4a)-Thiol-Addukt entsteht (Drepper *et al.*, 2007a). Während dieses photoaktiven Zustandes wird eine schwache Autofluoreszenz mit einer maximalen Emissionswellenlänge von 495 nm emittiert. Es folgt der erneute Übergang in den Dunkelzustand.

Ein Austausch des konservierten photoaktiven Cysteinrestes (Cys⁶² des YtvA; Cys⁵³ des SB2) gegen ein unpolares Alanin mittels Mutagenese führte zur Steigerung der schwachen Autofluoreszenz, hervorgerufen durch ein reduziertes Fluoreszenz-Quenching des FMN-Chromophors und der Unterbindung des LOV-Photozyklus' (Swartz *et al.*, 2001). Es gelang, die LOV-Derivate BsFbFP (*B. subtilis* FMN-basiertes Fluoreszenzprotein) und PpFbFP (*P. putida* FMN-basiertes Fluoreszenzprotein) funktionell in *E. coli* und im fakultativ anaeroben *Rhodobacter capsulatus* zu exprimieren (Drepper *et al.*, 2007a). Außerdem konnte eine gesteigerte Fluoreszenz in rekombinanten *E. coli*-Zellen durch die Anpassung der DNA-Sequenz des verkürzten Gens (LOV-Domäne; 137 Aminosäuren des N-terminalen YtvA-Bereichs) an den *E. coli*-Codongebrauch erreicht werden. Hervorzuheben ist, dass dieses Fluoreszenz-basierte *real-time* Reportersystem nicht nur unter aeroben, sondern auch unter anaeroben Bedingungen funktionsfähig ist. Daher stellt dieses FbFP-basierte Reportersystem eine hervorragende Grundlage für die Entwicklung eines Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems für die obligat anaeroben Clostridien dar.

1.4. Zielstellung

Die bis heute nicht vollständig geklärten Fragen zum regulatorischen Netzwerk machen *C. acetobutylicum* zu einem interessanten Forschungsobjekt. Der einzigartige Fermentationsmetabolismus bietet ein hohes Potenzial für biotechnologische Anwendungen und stellt zudem eine wissenschaftliche Herausforderung aufgrund lückenhafter grundlegender physiologischer und molekulargenetischer Kenntnisse dar. Dabei sind insbesondere Expressionsstudien von Lösungsmittelphasen- und Zellzyklus-spezifischen Genen interessant, da diese physiologischen Prozesse offensichtlich miteinan-

der gekoppelt sind. Die Aufklärung der regulatorischen Gene bzw. Proteine, die für das Umschalten zur Lösungsmittelbildung und Sporulation auf molekularer Ebene verantwortlich sind, würde diverse *Metabolic Engineering*-Strategien zur Butanolsteigerung durch *C. acetobutylicum* deutlich verbessern. Ein denkbarer experimenteller Ansatz zur Aufklärung dieses Phänomens ist die Identifizierung von entsprechenden Genen mittels eines *in vivo* Reportersystems und spezifischer Selektion (*Screening*). Neben diesem explorativen Ansatz kann ein clostridielles Fluoreszenz-Reporter-gen ebenfalls für verschiedene systematische Genexpressionsanalysen eingesetzt werden. Dazu können die Promotoren von Genen, die bekannte stoffwechselrelevante Enzyme kodieren, z. B. hinsichtlich ihrer Zellzyklus-abhängigen Induktion untersucht werden.

Die Bedeutung einer solchen Methode für zukünftige Forschungsarbeiten ist offensichtlich, sodass die Etablierung und Optimierung eines geeigneten *in vivo* Systems für Clostridien im Vordergrund dieser Arbeit stand und anschließend durch funktionelle Anwendungsnachweise belegt werden sollte.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen und Plasmide

In den nachfolgenden Tabellen 2.1, 2.2 und 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Stämme, Vektoren und rekombinanten Plasmide zusammengefasst.

Tab. 2.1: Stämme (*Stammsammlungs-Identifikationsnummer)

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Wildtyp	<i>American Type Culture Collection</i> (*258)
<i>C. acetobutylicum</i> pT	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT; Em ^R	Mann <i>et al.</i> , 2012 (*287)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>thlA</i>) <i>bs1</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>thlA</i>) <i>bs1</i> Em ^R , keine Fluoreszenz	Schulz, 2009 (*112)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>thlA</i>) <i>bs2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>thlA</i>) <i>bs2</i> Em ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*209)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Em ^R , Fluoreszenz	Schulz, 2009 (*117)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>thlA</i>) <i>pp1</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>thlA</i>) <i>pp1</i> Em ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*210)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Em ^R , Fluoreszenz	Schulz, 2009 (*118)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> Em ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*211)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>ptb</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>ptb</i>) <i>pp2</i> Em ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*232)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>adc</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>adc</i>) <i>pp2</i> Em ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*234)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>hydA</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>hydA</i>) <i>pp2</i> Em ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*347)
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>fac</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(<i>fac</i>) <i>pp2</i> Em ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*350)

Tab. 2.1: Stämme (Fortsetzung)

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> pTi	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pTi Em ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*396)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL82151	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL82151; Tm ^R	diese Arbeit (*237)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*238)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*239)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*240)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL83151	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL83151; Tm ^R	diese Arbeit (*241)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*242)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*243)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*244)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL84151	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL84151; Tm ^R	diese Arbeit (*245)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*246)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*247)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*248)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL85151	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL85151; Tm ^R	diese Arbeit (*249)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*250)
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*251)

Tab. 2.1: Stämme (Fortsetzung)

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> pMTL85151::P(<i>thlA</i>)pp3	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pMTL85151::P(<i>thlA</i>)pp3 Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*252)
<i>C. acetobutylicum</i> pTC	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pTC; Tm ^R	diese Arbeit (*356)
<i>C. acetobutylicum</i> pTC::P(<i>thlA</i>)pp2	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pTC::P(<i>thlA</i>)pp2 Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*357)
<i>C. acetobutylicum</i> pTC::P(<i>adhE2</i>)pp2	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pTC::P(<i>adhE2</i>)pp2 Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*360)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex</i> ::int(95)	<i>C. acetobutylicum rex</i> ::int(95) Gruppe-II-Intron (95./96. Bp von <i>rex</i>), Em ^R	Wietzke & Bahl, 2012 (*164)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex</i> ::int(95) pTC	<i>C. acetobutylicum rex</i> ::int(95) pTC; Em ^R , Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*361)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex</i> ::int(95) pTC::P(<i>thlA</i>)pp2	<i>C. acetobutylicum rex</i> ::int(95) pTC::P(<i>thlA</i>)pp2 Em ^R , Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*362)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex</i> ::int(95) pTC::P(<i>adhE2</i>)pp2	<i>C. acetobutylicum rex</i> ::int(95) pTC::P(<i>adhE2</i>)pp2 Em ^R , Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*365)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ptb</i> ::int(87)	<i>C. acetobutylicum ptb</i> ::int(87) Gruppe-II-Intron (87./88. Bp von <i>ptb</i>), Em ^R	Lehmann <i>et al.</i> , 2012b (*329)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ptb</i> ::int(87) pTC	<i>C. acetobutylicum ptb</i> ::int(87) pTC; Em ^R , Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*366)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ptb</i> ::int(87) pTC::P(<i>thlA</i>)pp2	<i>C. acetobutylicum ptb</i> ::int(87) pTC::P(<i>thlA</i>)pp2 Em ^R , Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*367)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ptb</i> ::int(87) pTC::P(<i>adhE2</i>)pp2	<i>C. acetobutylicum ptb</i> ::int(87) pTC::P(<i>adhE2</i>)pp2 Em ^R , Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*370)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd</i> ::int(69)	<i>C. acetobutylicum hbd</i> ::int(69) Gruppe-II-Intron (69./70. Bp von <i>hbd</i>), Em ^R	Lehmann & Lütke- Eversloh, 2011 (*334)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd</i> ::int(69) pTC	<i>C. acetobutylicum hbd</i> ::int(69) pTC; Em ^R , Tm ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*371)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd</i> ::int(69) pTC::P(<i>thlA</i>)pp2	<i>C. acetobutylicum hbd</i> ::int(69) pTC::P(<i>thlA</i>)pp2 Em ^R , Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*372)

Tab. 2.1: Stämme (Fortsetzung)

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd::int(69)</i> pTC::P(<i>adhE2</i>) <i>pp2</i>	<i>C. acetobutylicum hbd::int(69)</i> pTC::P(<i>adhE2</i>) <i>pp2</i> Em ^R , Tm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*375)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , φ80 <i>dlacZ</i> M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-l</i> , λ ⁻ , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169	Hanahan, 1983 (*272)
<i>E. coli</i> DH5α pThydA _{Ca} -C-tag	<i>E. coli</i> DH5α pThydA _{Ca} -C-tag Ap ^R , Em ^R	Girbal <i>et al.</i> , 2005 (*22)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs1</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs1</i> Ap ^R , Fluoreszenz	Schulz, 2009 (*109)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs2</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs2</i> Ap ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*159)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs3</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs3</i> Ap ^R , Fluoreszenz	Schulz, 2009 (*115)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp1</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp1</i> Ap ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*160)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i> Ap ^R , Fluoreszenz	Schulz, 2009 (*116)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp3</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp3</i> Ap ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*208)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>ptb</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>ptb</i>) <i>pp2</i> Ap ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*212)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>adc</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>adc</i>) <i>pp2</i> Ap ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*233)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>hydA</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>hydA</i>) <i>pp2</i> Ap ^R , keine Fluoreszenz	diese Arbeit (*235)
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>fac</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5α pT::P(<i>fac</i>) <i>pp2</i> Ap ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*349)
<i>E. coli</i> DH5α pTi	<i>E. coli</i> DH5α pTi Ap ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*395)
<i>E. coli</i> DH5α pMTL82151	<i>E. coli</i> DH5α pMTL82151; Cm ^R	Heap <i>et al.</i> , 2009 (*151)

Tab. 2.1: Stämme (Fortsetzung)

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*213)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*214)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL82151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*215)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL83151	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL83151; Cm ^R	Heap <i>et al.</i> , 2009 (*152)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*216)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*217)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*218)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL84151	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL84151; Cm ^R	Heap <i>et al.</i> , 2009 (*153)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*219)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*220)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*221)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL85151	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL85151; Cm ^R	Heap <i>et al.</i> , 2009 (*154)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*222)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*223)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*224)

Tab. 2.1: Stämme (Fortsetzung)

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α pTChydA _{Ca} -C-tag	<i>E. coli</i> DH5 α pTChydA _{Ca} -C-tag Ap ^R , Cm ^R /Tm ^R	M. Wietzke (*397)
<i>E. coli</i> DH5 α pTC	<i>E. coli</i> DH5 α pTC; Cm ^R	diese Arbeit (*351)
<i>E. coli</i> DH5 α pTC::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pTC::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*352)
<i>E. coli</i> DH5 α pTC::P(<i>adhE2</i>) <i>pp2</i>	<i>E. coli</i> DH5 α pTC::P(<i>adhE2</i>) <i>pp2</i> Cm ^R , Fluoreszenz	diese Arbeit (*355)
<i>E. coli</i> DH5 α pMTL007	<i>E. coli</i> DH5 α pMTL007 Cm ^R /Tm ^R	Heap <i>et al.</i> , 2007 (*2018)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (<i>nal</i> ^R), <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <i>glnV44</i> , F'[:Tn10, <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^R , Δ (<i>lacZ</i>)M15], <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺)	Stratagene (*15)
<i>E. coli</i> ER2275	<i>trp-31</i> , <i>his-1</i> , <i>tonA2</i> , <i>rpsL104</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>metB1</i> , <i>el4</i> ⁻ , Δ (<i>lac</i>)U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , R(<i>zbgZ10</i> ::Tn10) Tc ^S , Δ (<i>mcr-hsd-</i> <i>mrr</i>)114::1510, [F', <i>proAB</i> , <i>laqI</i> ^R Δ M15 <i>zsf</i> :: <i>mini-Tn10</i> (Km ^r)]	NEB, New England BioLabs (*271)

Tab. 2.2: Vektoren

Vektor	relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pANII	Tc ^R , Φ 3 <i>tl</i> ; p15A <i>oriR</i>	Laborsammlung/ Heap <i>et al.</i> , 2007
pMTL007	<i>fac</i> , IBS, EBS2, EBS1d, ClosTron- ErmRAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2- Terminator, <i>pCB102</i> , <i>catP</i> , ColE1, <i>lacl</i> , <i>oriT</i>	Laborsammlung/ Heap <i>et al.</i> , 2007
pTHydA _{Ca} -C-tag	<i>PthIA</i> , ATG, <i>ori</i> , <i>repL</i> ; C-term. <i>Strep</i> -tagII, Em ^R , Ap ^R , cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Laborsammlung/ Girbal <i>et al.</i> 2005
pTChydA _{Ca} -C-tag	<i>PthIA</i> , ATG, <i>ori</i> , <i>repL</i> ; C-term. <i>Strep</i> -tagII, Cm ^R /Tm ^R , Ap ^R , cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Laborsammlung/ M. Wietzke
pMTL82151	<i>ori</i> , <i>traJ</i> , <i>lacZ</i> , pBP1, <i>catP</i>	Laborsammlung/ Heap <i>et al.</i> , 2009
pMTL83151	<i>ori</i> , <i>traJ</i> , <i>lacZ</i> , pCB102, <i>catP</i>	Laborsammlung/ Heap <i>et al.</i> , 2009

Tab. 2.2: Vektoren (Fortsetzung)

Vektor	relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pMTL84151	<i>ori, traJ, lacZ, pCD6, catP</i>	Laborsammlung/ Heap <i>et al.</i> , 2009
pMTL85151	<i>ori, traJ, lacZ, pIM13, catP</i>	Laborsammlung/ Heap <i>et al.</i> , 2009

Tab. 2.3: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pGLOW-Bs2	Ap ^R , <i>rep</i> (pMB1), <i>lacP</i> , evoglow-Bs2-Gen	evocatal GmbH, Düsseldorf
pGLOW-Pp1	Ap ^R , <i>rep</i> (pMB1), <i>lacP</i> , evoglow-Pp1-Gen	evocatal GmbH, Düsseldorf
pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs1</i>	pTHyA _{Ca} -C-tag:: <i>bs1</i> (5' <i>Bam</i> HI – 3' <i>Kas</i> I; Insert: 786 Bp)	Schulz, 2009
pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs2</i>	pTHyA _{Ca} -C-tag:: <i>bs2</i> (5' <i>Bam</i> HI – 3' <i>Ssp</i> DI; Insert: 411 Bp)	diese Arbeit
pT::P(<i>thIA</i>) <i>bs3</i>	pTHyA _{Ca} -C-tag:: <i>bs3</i> (5' <i>Bam</i> HI – 3' <i>Kas</i> I; Insert: 419 Bp)	Schulz, 2009
pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp1</i>	pTHyA _{Ca} -C-tag:: <i>pp1</i> (5' <i>Bam</i> HI – 3' <i>Ssp</i> DI; Insert: 444 Bp)	diese Arbeit
pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i>	pTHyA _{Ca} -C-tag:: <i>pp2</i> (5' <i>Bam</i> HI – 3' <i>Kas</i> I; Insert: 452 Bp)	Schulz, 2009
pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp3</i>	pTHyA _{Ca} -C-tag:: <i>pp3</i> (5' <i>Bam</i> HI – 3' <i>Kas</i> I; Insert: 452 Bp)	diese Arbeit
pT::P(<i>ptb</i>) <i>pp2</i>	pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i> ::P(<i>ptb</i>) (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Bam</i> HI; Insert: 472 Bp)	diese Arbeit
pT::P(<i>adc</i>) <i>pp2</i>	pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i> ::P(<i>adc</i>) (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Bam</i> HI; Insert: 408 Bp)	diese Arbeit
pT::P(<i>hydA</i>) <i>pp2</i>	pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i> ::P(<i>hydA</i>) (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Bam</i> HI; Insert: 199 Bp)	diese Arbeit
pT::P(<i>fac</i>) <i>pp2</i>	pT::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i> ::P(<i>fac</i>) (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Bam</i> HI; Insert: 171 Bp)	diese Arbeit
pTi	pT::P(<i>fac</i>) <i>pp2</i> :: <i>lacI</i> (<i>Cl</i> I; Insert: 1694 Bp)	diese Arbeit
pTC::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i>	pTCHyA _{Ca} -C-tag::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i> (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Ssp</i> DI; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit
pTC::P(<i>adhE2</i>) <i>pp2</i>	pTC::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i> ::P(<i>adhE2</i>) (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Bam</i> HI; Insert: 332 Bp)	diese Arbeit
pMTL82151::P(<i>thIA</i>) <i>bs3</i>	pMTL82151::P(<i>thIA</i>) <i>bs3</i> (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Xba</i> I; Insert: 882 Bp)	diese Arbeit
pMTL82151::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i>	pMTL82151::P(<i>thIA</i>) <i>pp2</i> (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Xba</i> I; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit
pMTL82151::P(<i>thIA</i>) <i>pp3</i>	pMTL82151::P(<i>thIA</i>) <i>pp3</i> (5' <i>Sac</i> I – 3' <i>Xba</i> I; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit

Tab. 2.3: Rekombinante Plasmide (Fortsetzung)

Plasmid	Relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 882 Bp)	diese Arbeit
pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit
pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	pMTL83151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit
pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 882 Bp)	diese Arbeit
pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit
pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	pMTL84151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit
pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i>	pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>bs3</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 882 Bp)	diese Arbeit
pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit
pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	pMTL85151::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i> (5' <i>SacI</i> – 3' <i>XbaI</i> ; Insert: 915 Bp)	diese Arbeit

2.2. Oligonukleotide

Die in der Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.4 aufgelistet. Die Bezeichnungen fw bzw. rv bezeichnen *forward*- und *reverse*-Leserichtungen.

Tab. 2.4: Oligonukleotide

Name	5'→3' Sequenz*	Verwendung
Bs2_fw_BamHI Bs2_rv_KasI	AAAAAGGATCCGCGTCGTTCCAGTCGTTCCGG AAAAAGGCGCCTACCTCGAGCAGCTTTTCAT	Klonierung von <i>bs2</i> mittels <i>Bam</i> HI und <i>Kas</i> I (<i>Ssp</i> DI)
Pp1_fw_BamHI Pp1_rv_KasI	AAAAAGGATCCATCAACGCAAAACTCCTGCA AAAAAGGCGCCTACGTGCTTGGCCTGGCCCT	Klonierung von <i>pp1</i> mittels <i>Bam</i> HI und <i>Kas</i> I (<i>Ssp</i> DI)
Pp2_Alanin_fw Pp2_Alanin_rv	GCACAACCTACTTACGCAATAGGAATACAAA GAGATGTTACAGC GCTGTAACATCTCTTTGTATTCCTATTGCGT AAGTAAGTTGTGC	Mutageneseprimer, Tyr112Ala des <i>pp2</i> , Generierung <i>pp3</i>
Pptb_fw_SacI Pptb_rv_BamHI	AAAAAGAGCTCTATGAAGGATACAGTAA AAAAAGGATCCAATCACTGGTCGTACAC	Klonierung von P(<i>ptb</i>) mittels <i>Sac</i> I und <i>Bam</i> HI

Tab. 2.4: Oligonukleotide (Fortsetzung)

Name	5' → 3' Sequenz*	Verwendung
Padc_fw_SacI Padc_rv_BamHI	AAAAAGAGCTCTATTTATTTTTGTATTGG AAAAAGGATCCTTCATCCTTTAACATAAAAG	Klonierung von P(<i>adc</i>) mittels SacI und BamHI
Phyd_fw_SacI Phyd_rv_BamHI	AAAAAGAGCTCCTAATTCAATAATTTACTTA AAAAAGGATCCCATGTTTATCCTCCCAA	Klonierung von P(<i>hydA</i>) mittels SacI und BamHI
Pfac_fw_SacI Pfac_rv_BamHI	AAAAAGAGCTCATGTCTTTAAATATAGATAA AAAAAGGATCCCATATGAAATACACCTCCTT	Klonierung von P(<i>fac</i>) mittels SacI und BamHI
LacI_fw_ClaI LacI_rv_ClaI	AAAAAATCGATTGCAGATAATTCAGGGAATT AAAAAATCGATAATTCCTAACTCACATTAATG	Klonierung von <i>lacI</i> mittels ClaI
PadhE2_fw_SacI PadhE2_rv_BamHI	AAAAAGAGCTCTAATAATACGTAATACACC AAAAAGGATCCCATTATATACACTCCTTTAT	Klonierung von P(<i>adhE2</i>) mittels SacI und BamHI
PthI_fw_SacI Bs3_rv_XbaI Pp2_3_rv_XbaI	AAAAAGAGCTCTGATAAATATGAACATGATG AAAAATCTAGATTTTATTCAAGAAGCTTTTC AAAAATCTAGATTTTAAATGTTTTGCTTGCTC	Klonierung von P(<i>thIA</i>)/ <i>bs3/pp2/pp3</i> , mittels SacI und XbaI
pT_seq_fw pT_seq_rv	GGGATAAACTATGGAAC TTATGAAA TGCAAGAATGTGAGAGCTAGAAA	Sequenzierung der FbFP-Gene in pT/pTC
pT_seq_fw_P pT_seq_rv	GAGCCGATTTCAAAGATATTATCATG TGCAAGAATGTGAGAGCTAGAAA	Sequenzierung der Promotoren in pT/pTC
M13F M13R	ACTGGCCGTCGTTTTACA CAGGAAACAGCTATGACC	Sequenzierung der pMTL80000-Plasmide

* Die in den Primersequenzen hervorgehobenen Basen symbolisieren entsprechende Restriktionschnittstellen bzw. die Position des Austauschs von Tyrosin¹¹² gegen Alanin im *pp2*-Gen (Tyr112Ala).

2.3. Nährmedien

Sofern nicht anders dokumentiert, wurden alle hitzestabilen Lösungen und Nährmedien bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Einwegfilter; Porengröße 0,2 µm; Sarstedt).

2.3.1. Medium zur Anzucht von *Escherichia coli*

E. coli-Zellen wurden in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C angezogen. Im Bedarfsfall wurden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Medienzusätze hinzugefügt.

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

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

Zur Herstellung fester Nährmedien erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von 1,5 % [w/v] Agar-Agar.

2.3.2. Medien zur Anzucht von *Clostridium acetobutylicum*

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* erfolgte in anaeroben Medien, die nach Breznak & Costilow (1994) hergestellt wurden. Nach Einstellung des pH-Werts wurden die Medien in der Mikrowelle bis zum Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin (Endkonzentration 0,1 % [w/v]) aufgeköcht, um gelösten Sauerstoff zu entfernen. Anschließend kühlte das Medium unter Stickstoff-Begasung ab, um ein erneutes Lösen von Sauerstoff zu verhindern. Die Kulturgefäße wurden luftdicht verschlossen und autoklaviert. Vor Verwendung der Nährmedien konnte durch den Einsatz des Reduktionsmittels Titan-(III)-Nitrilotriessigsäure eventuell vorhandener Restsauerstoff entfernt werden. Der Glukosezusatz erfolgte nach dem Autoklavieren aus einer sterilen und ebenfalls anaeroben Stammlösung (50 % [w/v]).

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

Glukose x H ₂ O (50 % [w/v])*	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>	<i>ad</i>	1000 ml

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

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

Glukose	60	g
K ₂ HPO ₄	0,55	g
KH ₂ PO ₄	0,55	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,011	g
Eisessig	2,3	ml
PABA (8 mg/l)*	5	ml
Biotin (0,08 mg/l)*	4	ml
MES	21,3	g
Resazurin (0,1 %, [w/v])	1	ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

* Diese Komponenten wurden aus einer 100-fach Stammlösung vor dem Autoklavieren zugegeben.

Vor der Zugabe von MES erfolgte die Einstellung des pH-Werts mit NH₄OH auf 6,6. Das Medium wurde auch zur Herstellung von Sporensuspensionen genutzt.

RCA-Medium (reinforced clostridial agar)

Glukose	5 g
Hefeextrakt	3 g
Trypton	10 g
NaCl	5 g
Fleischextrakt	10 g
Na ₂ -Acetat x H ₂ O	3 g
Cystein-HCl	0,5 g
Stärke	1 g
Agar-Agar	15 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000 ml

Das RCA-Medium wurde als Komplettmedium von der Firma Oxoid (Wesel) bezogen. Der pH-Wert lag ohne weitere Einstellungen bei 6,8.

2.3.3. Medienzusätze

Wie unter 2.3.1 beschrieben, wurden den Nährmedien im Bedarfsfall die in der folgenden Tabelle aufgeführten Medienzusätze beigelegt. Der Zusatz der Antibiotika erfolgte steril nach Autoklavieren und Abkühlung der Medien auf unter 50 °C. Alle Medienzusätze wurden in Aliquots bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Tab. 2.5: Medienzusätze

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 mg/ml <i>A. dest.</i> (sterilfiltriert*)	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml Ethanol (96 % [v/v])**	45 µg/ml
Thiamphenicol	50 mg/ml Ethanol (96 % [v/v])**	15 µg/ml
Erythromycin	50 mg/ml Ethanol (96 % [v/v])**	20 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml Ethanol (50 % [v/v])**	10 µg/ml

* Porengröße 0,2 µm (Sterilfilter, Schleicher & Schuell, Dassel)

** in Ethanol gelöste Substanzen wurden nicht sterilfiltriert

Titan-(III)-NTA-Lösung

Der Ansatz der Titan-(III)-NTA-Lösung erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Um 75 ml einer 100 mM Titan-(III)-NTA-Lösung herzustellen, wurden 5,73 g Nitritotriessigsäure (400 mM) in 30 ml *A. dest.* und 20 ml 5 M NaOH gelöst. Anschließend wurde

diese Lösung mit Stickstoff durchgast und so der vorhandene Luftsauerstoff entfernt. In der Anaerobenbox fand unter ständigem Rühren die Zugabe von 6,4 ml einer 15 %igen [w/v] TiCl_3 -Lösung und 10 ml einer anaeroben 2 M Na_2CO_3 -Lösung statt. Die fertige Lösung wurde mit anaerobem *A. dest.* aufgefüllt und sterilfiltriert.

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

* anaerob

2.4. Stammhaltung

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme wurden vorübergehend in LB-Flüssigmedium (2.3.1) bis zu 7 Tage bzw. auf LB-Festmedien bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Stammhaltung wurde 1 ml einer exponentiell wachsenden LB-Kultur mit 0,5 ml LB-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v]) versetzt, anschließend gründlich durchmischt und bei -70 °C gelagert. Die Vitalität und Reinheit der Stammkulturen wurde durch erneutes Ausstreichen auf Antibiotika enthaltenden Selektionsplatten geprüft.

Die Stammhaltung von *C. acetobutylicum* erfolgte bei -20 °C als Sporensuspension im MS-MES-Medium (2.3.2). Die in dieser Arbeit erzeugten Stämme wurden nach Sporenbildung zur Langzeitaufbewahrung bei -70 °C gelagert. Hierfür wurden MS-MES-Kulturen bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen angezogen (Antibiotika-Zusatz). Eine Inkubation dieser Kulturen erfolgte bis zur Sporulation.

2.5. Batch-Kulturen

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* erfolgte anaerob unter abgeschlossener Stickstoffatmosphäre in Hungate-Röhrchen oder in Müller & Krempel-Serumflaschen. Batch-Kulturen (10 ml) wurden mit 0,1 Vol. einer MS-MES-Sporensuspension (2.4.) inokuliert, bevor die Sporenceimung durch Pasteurisierung (10 min, 80 °C) aktiviert wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C. Diese 10 ml-Kulturen konnten zudem zur

Inokulation von Batch-Hauptkulturen (50 ml, 200 ml) eingesetzt werden. Die Anzucht der Batch-Hauptkulturen erfolgte je nach vorgesehenem Zweck in Müller & Krempel-Serumflaschen unterschiedlicher Volumina. Dabei war zu beachten, dass die Serumflaschen aufgrund des zu erwartenden Druckanstieges durch Gasentwicklung bei Wachstum der Kulturen nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens befüllt wurden.

2.6. Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedien

C. acetobutylicum konnte ebenfalls auf Festmedien (2.3.2) ausplattiert werden. Diese wurden zuvor aerob gegossen und einen Tag vor Gebrauch in eine Anaerobenkammer (MACS-MG 500, Meintrup, Löhden-Holte) eingeschleust. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter Stickstoffatmosphäre. Zur Reduktion von eingetragener Sauerstoff wurde eine maximale Konzentration von 5 % [v/v] an Wasserstoff zugegeben.

2.7. Bestimmung physiologischer Parameter

2.7.1. Messung der Optischen Dichte

Die Optische Dichte diente als Wachstumsparameter für Flüssigkulturen und wurde zur Beurteilung des Zellwachstums bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektralphotometer (Zeiss Spekol 1100, Jena Analytik, Jena) gegen einen entsprechenden Medienleerwert bestimmt. Die Messung erfolgte dabei in Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Ab einer Optischen Dichte (OD_{600}) von ca. 0,3 wurde die Zellsuspension mit entsprechendem Medium verdünnt. Zur Bestimmung der Zelldichte von Kulturen in Hungate-Röhrchen oder Schikanekolben wurde ein Röhrchenaufsatz verwendet.

2.7.2. Bestimmung des pH-Werts

Der pH-Wert zellfreier Überstände wurde nach der Sedimentation der Zellen (13000 Upm, 4 °C, 5 min) mittels pH-Meter (pH Meter Seven Easy, Mettler Toledo GmbH, Giessen) ermittelt.

2.7.3. Lichtmikroskopie

Die Analyse der Zellmorphologie erfolgte mittels Hellfeldmikroskopie und Phasenkontrast (Olympus CHS-Mikroskop, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) bei einer 400-fachen Vergrößerung (Objektiv: A40LP). Die Zellsuspension wurde auf einem mit vergälltem Ethanol (70 % [v/v]) gereinigten Objektträger mit einem ebenso gereinigten Deckgläschen mikroskopiert.

2.7.4. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Anfertigung Fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen wurden exponentiell wachsende *C. acetobutylicum*-Zellen (MS-MES) mit einem Fluoreszenz-Lichtmikroskop (Olympus BX51, UPlan FL 100 NA Objektiv) unter Verwendung eines blauen dichroitischen Spiegels (U-MWB2) verwendet. Die Fotos wurden bei Expositionszeiten von 500-1000 ms mit einer digitalen Kamera (Olympus ColorView 12) aufgenommen, die an einen PC angeschlossen war und die Analysis Pro 3.02 Software verwendete.

2.7.5. Gaschromatographie

Zur Quantifizierung flüssiger Fermentationsprodukte wurden gaschromatographische Analysen unter Verwendung eines Agilent 7890A Gaschromatographen (Agilent Technologies, Böblingen) mit Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. Als Trägergas diente Stickstoff, welches über einen Feuchtigkeitsfilter und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde, um neben Wasser und Sauerstoff auch schwefelige und chlorierte Substanzreste zurückzuhalten. Die eingesetzten FID-Brenngase, synthetische Luft und Wasserstoff wurden zur Entfernung organischer Substanzen über einen Aktivkohlefilter geführt.

2.7.5.1. Probenvorbereitung

Die zur Analyse vorgesehenen Zellsuspensionen wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen überführt und zentrifugiert (13000 Upm, 4 °C, 5 min), um einen zellfreien Überstand zu erhalten. Jeweils 100 µl des Kulturüberstandes, 900 µl Wasser (UV-clear) und 100 µl interner Standard (500 mM Isobutanol in 2 M HCl und 1,5 M Acetoin) wurden in ein Rollrandgefäß (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) überführt. Anschließend wurden die Gefäße mit Bördelkappen (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) luftdicht verschlossen.

Für die Analyse wurden 0,5 µl der Probe über einen automatisierten Probengeber in das System injiziert.

2.7.5.2. Quantifizierung

Mit Hilfe einer Eichlösung, die je 5 mM der zu quantifizierenden Produkte einschließlich des internen Standards enthielt, gelang die Erstellung eines Eichchromatogramms. Die Steuerung des Gaschromatographen und des Probengebers sowie die Auswertung der Signale erfolgte unter Anwendung des Programms EZChrom *Elite* (Agilent Technologies, Böblingen).

2.7.5.3. Analysebedingungen

Zur Detektion der Substanzen Acetat, Butyrat, Aceton, Butanol und Ethanol wurden folgende Analysebedingungen gewählt:

Chromatographiesäule:	2 m x 3 mm x 1,6 mm Chromosorb 101 (80/100 mesh)
Säulentemperatur:	155 - 195 °C
Trärgas:	N ₂ (23 ml/min total flow; 3 ml/min <i>septum purge flow</i>)
Injektor:	195 °C
Detektor:	FID, 203 °C
Probenvolumen:	0,5 µl

2.8. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.8.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Lösungen und Geräte wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert, um eventuell vorhandene Nukleasen zu inaktivieren, wohingegen bei hitzelabilen Lösungen die Sterilität durch Sterilfiltration (Einwegfilter, Porengröße 0,2 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) gewährleistet wurde. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 96 %igem [v/v] Ethanol behandelt oder abgeflammt. Die Desinfektion von Arbeitsflächen und hitzelabilen Gebrauchsgegenständen erfolgte mit vergälltem Ethanol (70 % [v/v]).

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

Die Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach den Prinzipien der alkalischen Lyse von Birnboim & Doly (1979). Zur Plasmid-DNA Gewinnung dienten in der Regel 5 ml einer Übernachtskultur, die wie folgt behandelt wurden:

1. Anzucht einer Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium (2.3.1.)
2. Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation (13000 Upm, 1 min, 4 °C)
3. Resuspendieren des Zellpellets in 300 µl Puffer P1 (Vortexen)
4. Zugabe von 300 µl Puffer P2, 5 - 6 x invertieren; Inkubation (5 min bei RT)
5. Zugabe von 300 µl Puffer P3, 5 - 6 x invertieren
6. Inkubation: 5 min bei RT
7. Zentrifugation: 20 min, 13000 Upm, 4 °C
8. Überführung des Überstands in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß
9. Zentrifugation: 10 min, 13000 Upm, 4 °C
10. 0,8 Vol. Isopropanol in einem neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorlegen
11. Überführung des Überstandes in die Isopropanollösung (Vortexen)
12. Zentrifugation: 20 min, 13000 Upm, 4 °C
13. Verwerfen des Überstandes
14. Waschen des DNA-Pellets mit 500 µl Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt)
15. Zentrifugation: 5 min, 13000 Upm, 4 °C
16. Abnehmen des Überstandes, Trocknen des Pellets, Aufnahme in *A. dest.*

Puffer P1

50 mM Tris-HCl (pH 8)	10 ml	aus 1 M Stammlösung
10 mM EDTA (pH 8)	4 ml	aus 0,5 M Stammlösung
100 µg/ml RNase A	2 ml	aus 10 mg/ml Stammlösung
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	200 ml

Die Zugabe von RNase A erfolgte nach dem Autoklavieren. Eine Lagerung war bei 4 °C möglich.

Puffer P2

1 % [w/v] SDS		10 ml	aus 10 % Stammlösung
200 mM NaOH		2 ml	aus 1 M Stammlösung
A. dest.	<i>ad</i>	100 ml	

Der Puffer wurde nicht autoklaviert. Eine Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Puffer P3

3 M Kaliumacetat		58,88 g	
A. dest.	<i>ad</i>	200 ml	

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 5,5 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tris-NaCl-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 8)		1 ml	aus 1 M Stammlösung
15 mM NaCl		0,09 g	
A. dest.	<i>ad</i>	100 ml	

Der Puffer wurde nicht autoklaviert. Eine Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

RNase A-Lösung

RNase A (Roth)		10 mg	
Tris-NaCl-Puffer (pH 8)	<i>ad</i>	1 ml	

Nach dem Ansetzen wurde die Lösung zur Inaktivierung von DNasen für 15 min auf 100 °C erhitzt und nach dem Abkühlen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.8.3. Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* wurden 200 ml CGM-Medium (2.3.2.) mit 10 % [v/v] Zellsuspension einer entsprechenden Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 5000 Upm, 4 °C; Sorvall RC5C; Rotor SLA-3000) sedimentiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, in 2 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die chromosomale DNA wurde nach Bertram (1989) wie folgt isoliert:

1. Resuspension gefrorener Zellpellets in 1 ml Waschpuffer
2. Zentrifugation: 5 min, 5000 Upm, 4 °C
3. Wiederholung der Schritte 1 - 2
4. Suspendieren des Zellpellets in 1 ml Lysispuffer
5. Zugabe von 100 µl Lysozym-Lösung und 5 µl RNase A-Lösung
6. Ansatz schwenken und Inkubation für 30 min bei 37 °C
7. Zugabe von 30 µl N-Laurylsarkosin (20 % [w/v]), Ansatz schwenken
8. Inkubation: 5 - 30 min, 37 °C
9. Extraktion mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v])
10. Zentrifugation: 10 min, 7500 Upm, 4 °C
11. Abnahme der oberen wässrigen Phase
12. Zweimalige Wiederholung der Schritte 10 - 12
13. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) zur Phenolentfernung
14. Zentrifugation: 5 min, 7500 Upm, 4 °C
15. Abnahme der oberen wässrigen Phase
16. Fällung der DNA durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2), sowie 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst)
17. Inkubation: 5 min bei RT
18. Zentrifugation: 15 min, 5000 Upm, 4 °C
19. Trocknen des DNA-Pellets für 60 min, anschließende Aufnahme in 60 µl TE-Puffer
20. Zugabe von 15 µl RNase A-Lösung
21. Inkubation: 15 min, 37 °C
22. Zugabe von 30 µl Proteinase K-Lösung
23. Inkubation: ü. N. bei 37 °C
24. Erhöhung des Ansatzes mit sterilem *A. dest.* auf 400 µl
25. Zugabe von 60 µl 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2)
26. Extraktion mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v])
27. Zentrifugation: 10 min, 7500 Upm, 4 °C
28. Abnahme der oberen wässrigen Phase
29. Zweimalige Wiederholung der Schritte 26 - 28
30. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v])

31. Zentrifugation: 5 min, 7500 Upm, 4 °C
32. Abnahme der oberen wässrigen Phase
33. Fällung der DNA durch Zugabe von 0,1 Vol. Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst)
34. Inkubation: 5 min bei RT
35. Zentrifugation: 15 min, 5000 Upm, 4 °C
36. Zweimaliges Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst)
37. Trocknen des Pellets und Aufnahme in 25 µl sterilem TE-Puffer

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (2.8.6.) konnte die Qualität der isolierten DNA überprüft werden.

Waschpuffer

0,1 M EDTA (pH 8)		80 ml	aus 0,5 M Stammlösung
50 mM Tris-HCl (pH 8)		20 ml	aus 1 M Stammlösung
0,5 M KCl (pH 8)		50 ml	aus 1 M Stammlösung
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	400 ml	

Lysispuffer

0,1 M NaCl		4 ml	aus 5 M Stammlösung
50 mM EDTA (pH 8)		20 ml	aus 0,5 M Stammlösung
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	200 ml	

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

Lysozym-Lösung

Lysozym		400 mg
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1 ml

Die Lysozym-Lösung wurde für den Gebrauch frisch angesetzt.

20 % N-Laurylsarkosin-Lösung [w/v]

N-Laurylsarkosin		10 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	50 ml

RNase A-Lösung

RNase A	10	mg	
10 mM Tris-HCl (pH 8)	100	µl	aus 1 M Stammlösung
15 mM NaCl	9	mg	
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1	ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert. Zur Inaktivierung von DNasen erfolgte zuvor ein Erhitzen der Lösung auf 100 °C für 15 min. Nach dem Abkühlen wurden 1 ml-Aliquots bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 8)	800	µl	aus 1 M Stammlösung
1 mM EDTA	160	µl	aus 0,5 M Stammlösung

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Proteinase K-Lösung

Proteinase K	20	mg	
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1	ml

Die Lösung wurde in 30 µl-Aliquots bei -20 °C gelagert. Nach einmaligem Auftauen wurden Reste der Lösung verworfen (Sambrook & Russel, 2001).

2.8.4. Enzymatische Modifikationen von DNA**2.8.4.1. Restriktion von DNA**

Die sequenzspezifische Hydrolyse von Nukleinsäuren durch Restriktionsenzyme diente der Erzeugung von Fragmenten mit definierten Enden. Restriktionen wurden in dem vom Hersteller (Fermentas) empfohlenen Puffer und einem Volumen von mindestens 10 µl für die Restriktion von 1 µg DNA durchgeführt. Die Hydrolyse von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten wurde in der Regel für 2-15 h bei 37 °C durchgeführt. Um unspezifische Reaktionen der Restriktionsendonukleasen zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass der Anteil des eingesetzten Enzyms 10 % des Gesamtvolumens nicht überschritt. Kontrollrestriktionen konnten durch Zugabe von 6x Loading Dye abgestoppt werden, andernfalls erfolgte eine Hitzeinaktivierung. Die in dieser Arbeit

genutzten Restriktionsendonukleasen, deren Erkennungssequenzen und Puffer sind der nachfolgenden Tabelle 2.6 zu entnehmen.

Tab. 2.6: Restriktionsendonukleasen

Restriktions- endonuklease	Erkennungs- sequenz	Puffersystem	Inaktivierung
<i>Bam</i> HI	5'...G [^] GATCC...3' 3'...CCTAG [^] G...5'	1x <i>Bam</i> HI-Puffer, 1x Tango TM	80 °C, 20 min
<i>Cl</i> AI	5'...AT [^] CGAT...3' 3'...TAGC [^] TA...5'	1x Tango TM	65 °C, 20 min
<i>Dpn</i> I	5'...Gm ⁶ A [^] TC...3' 3'...CT [^] m ⁶ AG...5'	1xPuffer B, 1x Puffer G, 1x Tango TM	80 °C, 20 min
<i>Hind</i> III	5'...A [^] AGCTT...3' 3'...TTCGA [^] A...5'	1x Puffer R	80 °C, 20 min
<i>Nde</i> I	5'...CA [^] TATG...3' 3'...GTAT [^] AC...5'	10x Puffer O	65 °C, 20 min
<i>Pst</i> I	5'...CTGCA [^] G...3' 3'...G [^] ACGTC...5'	1x Puffer O, 1x Puffer R	80 °C, 20 min
<i>Sac</i> I	5'...GAGCT [^] C...3' 3'...C [^] TTCGAG...5'	1x <i>Sac</i> I-Puffer	65 °C, 20 min
<i>Sat</i> I	5'...GC [^] NGC...3' 3'...CGN [^] CG...5'	10x Puffer G	65 °C, 20 min
<i>Ssp</i> DI	5'...G [^] GCGCC...3' 3'...CCGCG [^] G...5'	1x Tango TM	80 °C, 20 min
<i>Xba</i> I	5'...T [^] CTAGA...3' 3'...AGATC [^] T...5'	1x Tango TM	65 °C, 20 min

([^]) Restriktionsschnittstelle, (N) G, A, T oder C

2.8.4.2. Dephosphorylierung von DNA

Nach der enzymatischen Hydrolyse schloss sich eine Dephosphorylierung am 5'-Ende der verwendeten Vektoren an (Sambrook & Russel, 2001). Dieser Schritt diente der Unterbindung einer Selbstligation der linearisierten Vektoren während der anschließenden Ligation (2.8.4.3.). Zum inaktivierten Restriktionsansatz (bis zu 10 µg linearisierte Vektor-DNA) wurden 1 U/µl „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP, Fermentas, St. Leon-Rot) und 1x SAP-Puffer (10x konzentriert) gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch eine Hitzebehandlung bei 80 °C für 10 min. Um Restaktivitäten des Enzyms zu verhindern, wurden die Ansätze im Anschluss aufgereinigt (2.8.5.2.).

2.8.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (Fermentas) unter Verwendung der *T4*-Ligase durchgeführt. Um die Ligationseffizienz zu erhöhen erfolgte die Wahl des molaren Verhältnisses von Vektor zu Insert auf Grundlage folgender Berechnung:

$$\frac{2 \times 10^6}{\text{Bp} \times 660} = \frac{\text{pmol Enden}}{\mu\text{g DNA}}$$

Das Standardvolumen der Ligation (5 U/μl) betrug 20 μl. Die *T4*-DNA-Ligase wurde mit einer Konzentration von 0,25 U/μl im entsprechenden Reaktionspuffer eingesetzt. Die Ligationen erfolgten für 3 h bei 22 °C bzw. ü. N. bei 16 °C. Anschließend trug eine Hitzeinaktivierung der *T4*-DNA-Ligase bei 65 °C für 10 min zur Erhöhung der Transformationseffizienz bei. Die ligierten Plasmide konnten direkt für die Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen (2.9.3.) eingesetzt werden.

2.8.5. Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.8.5.1. Isopropanolfällung (Sambrook & Russel, 2001)

Diese Methode wurde vor allem bei der Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* verwendet. Sie ist näher unter 2.8.2. beschrieben.

2.8.5.2. Aufreinigung mittels Geneclean® Turbo Kit

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR- oder Restriktions-Reaktionsansätzen wurde das Geneclean® Turbo Kit nach Herstellerangaben (MP Biomedicals, Eschwege) genutzt.

2.8.5.3. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Geneclean® Turbo Kit (MP Biomedicals, Eschwege) genutzt. Die gewünschte DNA-Bande wurde nach der Färbung im Ethidiumbromidbad unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und den Angaben des Herstellers entsprechend mit den im Kit zur Verfügung gestellten Puffern aus der Agarose extrahiert. Abschließend erfolgte eine Kontrolle mittels Gelelektrophorese (2.8.6.).

2.8.6. Agarosegelelektrophorese (Sambrook & Russel, 2001)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen zum Zweck der Analyse und Präparation wurde in horizontalen Agarosegelen in Agargel-Mini-Kammern (Whatman Biometra, Göttingen) durchgeführt. In Abhängigkeit der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente variierte die Agarosekonzentration in 1x TAE-Puffer zwischen 0,8-2 % [w/v]. Die DNA-Proben wurden zur Beschwerung und Visualisierung der Lauffront vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt. Als Längensstandards dienten der GeneRuler™ 1 kb Ladder oder der MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), die gleichzeitig zur Konzentrationsbestimmung herangezogen wurden. Die Elektrophorese verlief zumeist bei einer konstanten Spannung von 70 bis 90 V (Power Pack P 25; Biometra) für 0,5 bis 1,5 h unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer. Nach Inkubation des Gels im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml *A. dest.*) für 15 bis 30 min konnten die DNA-Fragmente mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage unter UV-Licht (Wellenlänge: 245 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

50x TAE (Sambrook & Russel, 2001)

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

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

6x Loading Dye

Bromphenolblau [w/v]	0,25	%
Xylencyanol [w/v]	0,25	%
Glycerin [v/v]	30	%
EDTA (0,5 M, pH 8)	50	mM

2.8.7. *In vitro*-Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde eingesetzt, um Fragmente für Klonierungsreaktionen zu amplifizieren. Die PCR-Reaktionen fanden in Thermocyclern mit Deckelbeheizung (PCR-Cycler, Biometra) statt.

2.8.7.1. Primerdesign

Für die Amplifikation der verwendeten Gensequenzen wurden entsprechende Primer abgeleitet. Unter Billigung von Fehlpaarungen wurden am 5'- und 3'-Ende Restriktionschnittstellen eingefügt, um eine spätere Klonierung der PCR-Fragmente in entsprechende Vektoren zu ermöglichen. Es wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer eines Paares ähnlich waren, um während des Annealings nahezu gleichartige Bedingungen zu schaffen. Die Schmelzpunkte ließen sich nach folgender Formel berechnen:

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

GC % prozentualer Gehalt der Basen Guanin und Cytosin
L Länge in Desoxynukleotiden

2.8.7.2. Standard-PCR-Reaktionsbedingungen

Für eine Standard-PCR wurde die *Pwo*-Polymerase genutzt. Der Standard-PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template DNA (1 ng/μl)	1	μl
fw-Primer (10 μM)	10	μl
rv-Primer (10 μM)	10	μl
dNTP-Gemisch (10 mM)	1	μl
10x <i>Pwo</i> -Puffer (komplett)	5	μl
<i>Pwo</i> -Polymerase (1 U/μl)	0,5	μl
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	50

Abweichend vom Standard-PCR-Reaktionsansatz wurden alternative Reaktionsansätze genutzt. So erfolgten Variationen der Template-DNA-Konzentration (1 ng bzw. 5 ng) und der MgSO_4 -Konzentration des Reaktionspuffers (3,0/3,5/4,0 mmol).

Es wurde folgendes Reaktionsschema genutzt:

Denaturierung	94 °C	5 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 s	} 30 – 35 x
Annealing	$T_m - (3 \text{ bis } 5 \text{ °C})$	60 s	
Amplifikation	72 °C	1 min/kBp	
Abschlussynthese	72 °C	10 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	

2.8.7.3. Ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Der Austausch von Aminosäuren erfolgte nach Angaben des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Die Mutageneseprimer sind in Tab. 2.4 aufgeführt.

2.9. Erzeugung rekombinanter Mikroorganismen

2.9.1. Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Um *E. coli*-Zellen zur Aufnahme von Fremd-DNA zu befähigen, erfolgte eine Behandlung mit CaCl₂ (Hanahan, 1983; mod.). Es wurde wie folgt vorgegangen:

1. Ausplattieren von *E. coli* auf LB-Agar, Inkubation ü. N. bei 37 °C
2. Überimpfen einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium, Inkubation ü. N. bei 37 °C, 180 Upm
3. Animpfen von 250 ml vorgewärmten LB-Medium mit 2,5 ml der Vorkultur, Inkubation bei 37 °C, 180 Upm, Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5
4. Inkubation der Kultur für 5 min auf Eis
5. Zentrifugation: 5 min, 4000 x g, 4 °C
6. Dekantieren des Überstandes und vorsichtiges Resuspendieren des Pellets in 75 ml Puffer TFB1
7. 90 min Inkubation auf Eis
8. Zentrifugation: 5 min, 4000 x g, 4 °C
9. Vorsichtiges Suspendieren des Pellets in 10 ml Puffer TFB2 (eiskalt)
10. Lagerung dieser Suspension in 100 µl-Aliquots bei -70 °C

Die Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Sorvall RC5C (Rotor SLA-3000).

TFB1

100 mM RbCl		1,21 g
50 mM MnCl ₂		0,99 g
30 mM Kaliumacetat		0,29 g
10 mM CaCl ₂		1,47 g
15 % Glycerin [v/v]		15 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	100 ml

Der pH-Wert von 5,8 wurde mit HCl eingestellt. Anschließend erfolgte eine Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm) des Puffers und eine Lagerung bei 4 °C.

TFB2

10 mM MOPS		0,21 g
10 mM RbCl		0,12 g
75 mM CaCl ₂		1,102 g
15 % Glycerin [v/v]		15 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	100 ml

Der pH-Wert wurde mit KOH eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert. Lagerung 4 °C.

2.9.2. Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein weiteres Verfahren zum Transfer von Fremd-DNA in *E. coli* stellte die Methode der Elektroporation dar (Dower *et al.*, 1988). Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Ausplattieren von *E. coli* auf LB-Agar, Inkubation ü. N. bei 37 °C
2. Überimpfen einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium, Inkubation ü. N. bei 37 °C, 180 Upm
3. Animpfen von 250 ml LB-Medium mit 5 ml der Vorkultur, Inkubation bei 37 °C, 180 Upm, Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bis 1,0
4. Inkubation der Kultur für 15-30 min auf Eis
5. Zentrifugation: 10 min, 6000 x g, 4 °C
6. Dekantieren des Überstandes, vorsichtiges Resuspendieren des Pellets in 1 Vol. sterilem *A. dest.* (kalt)

7. Zentrifugation: 10 min, 9000 x g, 4 °C
8. Wiederholung der Schritte 6 und 7
9. Aufnahme des Zellpellets in 30 ml Glycerinlösung (10 % [v/v])
10. Zentrifugation: 10 min, 9000 x g, 4 °C
11. Aufnahme der Zellen in 0,5-0,75 ml Glycerinlösung (10 % [v/v])
12. Lagerung der Suspension in 40 µl-Aliquots bei -70 °C

Die Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Sorvall RC5C (Rotor SLA-3000).

Glycerinlösung (10 % [v/v])

Glycerin (86 % [v/v])		10 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	100 ml

2.9.3. CaCl₂-vermittelte Transformation in *E. coli*

Die chemische Transformation von *E. coli* erfolgte unter Verwendung der durch die Ligation (2.8.4.3.) hergestellten Konstrukte und CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen. Der Vorteil dieser Methode bestand in der relativen Unempfindlichkeit für hohe Salzkonzentrationen im Ligationsansatz und der Möglichkeit zum Einsatz großer Lösungsvolumina. Ein Entsalzen des Ligationsansatzes war somit nicht notwendig, sodass ein weiterer Schritt zur Aufkonzentrierung des Ansatzes umgangen werden konnte. Die Transformation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Auftauen von 100 µl CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis
2. Zugabe von 10 µl Ligationsansatz zu den kompetenten Zellen
3. Inkubation des Transformationsansatzes für 30 min auf Eis
4. Inkubation: 90 s, 42 °C (Hitzeschock)
5. Abkühlen auf Eis
6. Zugabe von 500 µl LB-Medium
7. Inkubation: 60 min, 37 °C, 300 Upm (Thermomixer 5436, Eppendorf)
8. Ausplattieren von z. B. 50 µl und 100 µl Transformationsansatz auf LB-Agar mit entsprechenden Selektionszusätzen
9. Inkubation ü. N. bei 37 °C

Zur Überprüfung des Transformationsvorganges wurden Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium inokuliert und anschließend mittels Plasmidminipräparation (2.8.2.) überprüft.

2.9.4. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Methode der Elektroporation erfolgte prinzipiell nach Dower *et al.* (1988) unter Verwendung eines GenePulsersTMII (Bio-Rad Laboratories, München). Dabei wird durch elektrische Pulse eines sich entladenden Kondensators kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, welches mikroskopisch kleine Löcher in der Bakterienzellwand hervorruft, die sich nach kurzer Zeit wieder schließen. Hierfür wurden die nachfolgend aufgeführten methodischen Schritte abgearbeitet:

1. Plasmidsuspension 1:10 verdünnen
2. Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) bei -20 °C vorkühlen, anschließend auf Eis überführen
3. Auftauen elektrokompenter Zellen (2.9.2.) auf Eis
4. Zugabe von 38 µl kompetenter Zellen zu 2 µl Ligationsansatz
5. Elektroporation: 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV (Zeitkonstante 4,8 bis 5,2 ms)
6. Zugabe von 1 ml vorgewärmten LB-Medium (37 °C)
7. Inkubation: 60 min, 37 °C (erschütterungsfrei)
8. Ausplattieren von z. B. 10 µl, 50 µl und 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten
9. Inkubation ü. N. bei 37 °C

Eine erfolgreiche Transformation wurde durch Inokulation von Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium und anschließender Plasmidisolierung (2.8.2.) verifiziert.

2.9.5. Transformation von *C. acetobutylicum* mittels Elektroporation

Die Transformation von *C. acetobutylicum* wurde im Wesentlichen nach Mermelstein *et al.* (1992) mittels eines GenePulsersTMII (Bio-Rad Laboratories, München) durchgeführt. Für die Transformation wurden *in vivo* methylierte Plasmide eingesetzt. Realisiert wurde die Methylierung der Plasmide, indem diese in elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert wurden (2.9.4.), welche ein weiteres Plasmid (pANII) enthielten. pANII exprimiert eine Methyltransferase. Die Elektroporation erfolgte in

einer Anaerobenkammer (MACS-MG 500, Meintrup dws, Lähden-Holte) unter Verwendung von stets frisch hergestellten kompetenten *C. acetobutylicum*-Zellen. Dafür wurden 50 ml CGM-Medium aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von ca. 1,0 angezogen. Die weiteren, auf Eis durchgeführten Arbeitsschritte sind nachfolgend dargestellt:

1. Inkubation der Hauptkultur für 30 min auf Eis
2. Zentrifugation: 5 min, 5000 x g, 4 °C (3K30; Rotor 12150)
3. Waschen der Zellen mit 10 ml Elektroporationspuffer (vorgekühlt bei 4 °C)
4. Zentrifugation: 5 min, 5000 x g, 4 °C
5. Resuspendieren des Zellpellets in 2 ml Elektroporationspuffer
6. Überführen von 25 µl Plasmid-DNA und 350 µl kompetenten Zellen in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand, vorgekühlt bei -20 °C)
7. Inkubation der Küvette für 5 min auf Eis
8. Elektroporation: 50 µF, 600 Ω, 1,8 kV (Zeitkonstante 18 bis 22 ms)
9. Zugabe von 1 ml CGM-Medium
10. Überführung der Suspension in Schraubdeckelröhrchen
11. Inkubation: 4 h bei 37 °C
12. Ausplattieren von 200 µl Zellsuspension sowie Auftropfen von bis zu 500 µl auf RCA-Agar mit entsprechenden Selektionszusätzen
13. Inkubation: mind. 48 h, 37 °C, anaerob

Na-Phosphat-Puffer (pH 7,4)

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

Elektroporationspuffer

Na-Phosphat-Puffer (pH 7,4)	150	µl
270 mM Saccharose-Lösung (9,24 % [w/v])	ad	10 ml

2.10. Arbeiten mit Proteinen

2.10.1. Zellanzucht und Zellaufschluss mittels Ultraschall

Zur Untersuchung der heterologen Überexpression erfolgten die Anzucht von Zellkulturen und eine anschließende Isolation des Gesamt-Proteins. *C. acetobutylicum*-Kulturen wurden bei 37 °C ü. N. in 10 ml CGM-Medium (Antibiotika) angezogen. Aus dieser Vorkultur wurde eine entsprechende Hauptkultur inokuliert (50 ml CGM unter Antibiotika-Zusatz). Die Hauptkultur wurde bei 37 °C bis zum Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase inkubiert. Eine Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 14000 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde daraufhin in 2 ml sterilem *A. dest.* aufgenommen und anschließend entweder bei -20 °C gelagert oder sofort zum Zellaufschluss eingesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Ultrasonic Processor UP200S, Hielscher, Teltow) für 6 x 5 min bei 3 Zyklen und einer Amplitude von 80 % unter Kühlung auf Eis. Die Zelltrümmer wurden durch erneute Zentrifugation (1 min, 13000 Upm, 4 °C) entfernt und die löslichen Proteinfractionen zum Vergleich des Gesamtproteinextraktes eingesetzt. Es folgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (2.10.2.).

2.10.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in wässriger Lösung nach Bradford (1976) wurden die zu analysierenden Proben im Vorfeld mit destilliertem Wasser verdünnt (z. B. 1:10 [v/v], 1:20 [v/v]). Dabei wurden die Volumina so gewählt, dass letztlich 50 µl der verdünnten Probe zur Messung zur Verfügung standen. Die Probe wurde mit 1000 µl Bradford-Reagenz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm in Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm mittels Photometer (Ultrospec 3000, Amersham, Freiburg) gegen einen Blindwert aus 50 µl *A. dest.* und 1000 µl Bradford-Reagenz. Anhand einer mittels BSA (Albumin Fraktion V, Roth, Karlsruhe) erstellten Eichreihe im Bereich von 0-0,15 mg/ml konnte die Konzentration des Proteins in der wässrigen Lösung errechnet werden. Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

Bradford-Reagenz

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

Das Reagenz wurde filtriert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

2.10.3. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE nach Laemmli (1970, mod.) handelt es sich um eine Methode bei der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden. SDS (*sodium dodecyl sulfate*) bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die stark negative Ladung des SDS nivelliert die eigene Ladung der Proteine, sodass alle Proteine eine gleich stark negative Ladung aufweisen. Die SDS-PAGE erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers der Mini-Gelelektrophoresekammern (Whatman® Biometra, Göttingen) unter Verwendung der in Tab. 2.7 aufgeführten Gellösungen. Für das Sammelgel wurde ein Acrylamidgehalt von 4 % [w/v] verwendet, während für das Trenngel eine Konzentration von 12 % [w/v] genutzt wurde. Vor dem Auftrag der Proteinproben und der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden diese im Verhältnis von 4:1 [v/v] mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA (Sammelgel) bzw. 20 mA (Trenngel) in 1x Laufpuffer bei Raumtemperatur, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte. Zur Größenabschätzung der Proteine diente ein mitgeführter Marker (Fermentas, St. Leon-Rot).

Tab. 2.7: SDS-PAGE-Gellösungen

Reagenz	Sammelgel 4 %	Trenngel 12 %
A. dest.	3,12 ml	3,11 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml	-
4x Trenngelpuffer	-	1,88 ml
Acrylamid-Lsg. (40 % Acrylamid, AppliChem, Darmstadt)	0,52 ml	2,35 ml
APS (10 % [w/v])	100 µl	150 µl
TEMED	10 µl	10 µl

4x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		24,23	g
0,4 % SDS [w/v]		1,6	g
A. dest.	<i>ad</i>	400	ml

Der pH-Wert von 6,8 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

4x Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		72,68	g
0,4 % SDS [w/v]		1,6	g
A. dest.	<i>ad</i>	400	ml

Der pH-Wert von 8,8 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

10x Laufpuffer

0,25 M Tris		30	g
1,92 M Glycin		144	g
1 M SDS		10	g
A. dest.	<i>ad</i>	1000	ml

SDS-Probenpuffer

40 % Glycerin [v/v]		20	ml
40 mM DTE		4	ml aus 0,5 M Stammlösung
10 % SDS [w/v]		4,6	g
0,4 % Bromphenolblau [w/v]		0,2	g
250 mM Tris-HCl (pH 6,8)		12,5	ml aus 1 M Stammlösung
A. dest.	<i>ad</i>	50	ml

Die Lagerung des Puffers erfolgte in Aliquots à 2 ml bei -20 °C.

10 % [w/v] Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

Ammoniumpersulfat (APS)		10	g
A. dest.	<i>ad</i>	100	ml

2.10.4. Coomassie-Färbung

Die Färbung von eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen (2.10.3.) erfolgte nach der Methode von Neuhoff *et al.* (1988). Dazu wurden die SDS-Gele zunächst für mind. 1 h in Fixierer geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation in kolloidaler Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schwenken über Nacht. Die Entfärbung der Gele geschah durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser.

Fixierer

10 % Essigsäure [v/v]		100 ml
50 % Ethanol (96 % [v/v], reinst)		500 ml
A. dest.	<i>ad</i>	1000 ml

Coomassie-Färbelösung

Coomassie® Brilliantblau G-250		0,6 g
Coomassie® Brilliantblau R-250		0,6 g
Ethanol (96 % [v/v], reinst)		454 ml
Eisessig		92
A. dest.	<i>ad</i>	1000 ml

2.10.5. Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Der Western Blot (Towbin *et al.*, 1979) ermöglicht die Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran, auf der sie weiteren Detektionsverfahren leichter zugänglich sind als im Gel. Zunächst wurden 15 µl Gesamtproteinextrakt einer Zellkultur in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.10.3.). Als Referenz zur späteren Größenbestimmung diente ein Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). Der Western-Blot erfolgte in einer *Semi-Dry Fast-Blot* Apparatur (Typ B31, Biometra). Pro Gel wurden 6 Lagen Whatman Chromatographiepapier (2 mm, Whatman) sowie eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm, Biometra) auf Gelgröße zugeschnitten und kurz in Transferpuffer eingelegt. Dieser enthielt 20 % Ethanol ([v/v], reinst), welcher zum einen die Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran aktiviert und zum anderen einen schnelleren und effizienteren Proteintransfer vom Gel auf die Membran gewährleistet. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge luftblasenfrei

auf der Anodenplatte aufgebaut: 3x Whatman Chromatographiepapier, Nitrocellulosemembran, SDS-Gel (12 %ig), 3x Whatman Chromatographiepapier. Überschüssiger Puffer wurde mit saugfähigem Papier, Luftblasen durch Abrollen eines Reagenzglases auf dem Blot entfernt. Anschließend wurde die Apparatur durch Auflegen der Kathodenplatte unter leichtem Druck geschlossen und der Transfer bei einer konstanten Stromstärke von 5 mA/cm^2 Membran durchgeführt, bis die Spannung auf die Hälfte des Ausgangswertes gesunken war.

Transferpuffer

125 mM Tris		15,14	g
192 mM Glycin		14,4	g
20 % Ethanol (96 % [v/v], reinst)		200	ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000	ml

Die Lagerung erfolgte bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.10.6. Doppelimmunpräzipitation und Detektion

Der Proteinnachweis mittels Doppelimmunpräzipitation beruht auf der Kreuzreaktion eines primären Antikörpers (hier: evoglow[®]-Antikörper) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären Antikörpers (hier: Anti-IgG) an diesen Komplex. Mit Hilfe eines an den sekundären Antikörper gekoppelten Enzyms (z. B. Alkalische Phosphatase) erfolgt der Nachweis des gebildeten Komplexes über eine anschließende Farb-reaktion.

Die Detektion diente dem direkten Nachweis der Fluoreszenzproteine. Im Anschluss an den Western Blot (2.10.5) wurde die Membran mit 50 ml *Blocking Reagenz* (TBST, 5 % Magermilchpulver [w/v]) für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken bzw. ü. N. bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (kein Schütteln) inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 5 min mit TBST gewaschen. Es folgte die Zugabe der evoglow[®]-Antikörperlösung (gelöst in TBST; evocatal GmbH, Düsseldorf) sowie eine 60 minütige Inkubation unter leichtem Schwenken. Die Membran wurde anschließend für jeweils 30 min zweimal mit TBST gewaschen. Es schloss sich eine Inkubation unter Zugabe von 30 ml Anti-IgG-Antikörperlösung (gelöst in TBST; Sigma-Aldrich) für 45 min bei leichtem Schwenken an. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST für je 2 min folgte

die Initiation der Farbreaktion. Hierfür wurden 20 ml Reaktionspuffer unter Zugabe von 10 µl 7,5 % (w/v) Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) gelöst in 70 % (v/v) Dimethylformamid (DMF) und 60 µl 5 % (w/v) 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) gelöst in DMF zur Membran gegeben. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch mehrmaliges Waschen der Membran mit destilliertem Wasser. Die Membran wurde getrocknet und photodokumentiert.

TBST (Tris-buffered saline with Tween)

50 mM Tris-HCl (pH 6,8)	50 ml	aus 1 M Stammlösung
150 mM NaCl	8,77 g	
1 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2033 g	
0,2 % Tween20 [v/v]	2 ml	

Reaktionspuffer

100 mM NaCl	0,58 g	
5 mM MgCl ₂	0,1 g	
100 mM Tris-HCl (pH 8,8)	6,67 ml	aus 1,5 M Stammlösung
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	100 ml

2.11. Fluoreszenzmessungen

2.11.1. Probenvorbereitung

Für die Fluoreszenzmessungen wurden ü. N. *C. acetobutylicum*-Hungate-Kulturen (CGM oder MS-MES) bzw. *E. coli*-Kulturen (LB-Medium) mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz angezogen. Es wurden 2 ml-Zellproben sedimentiert (1 min, 13000 Upm, 4 °C) und zweimal in je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend konnten die gewaschenen Pellets in 1 ml PBS resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,7-0,9 manuell eingestellt werden. Hierbei wurde entsprechend mit PBS verdünnt. Die Einstellung der OD₆₀₀ diente der späteren Normalisierung der Messergebnisse.

PBS (phosphate buffered saline)

NaCl		8 g
KCl		0,2 g
Na ₂ HPO ₄		1,44 g
KH ₂ PO ₄		0,24 g
A. dest.	<i>ad</i>	1000 ml

2.11.2. Messparameter

Die quantitativen Fluoreszenzmessungen erfolgten an einem F-4500 Fluoreszenz Spektrophotometer (Hitachi) bzw. am SpectraMaxM2^e (Molecular Devices). Die vorbereiteten Proben (2.11.1.) wurden in Fluoreszenzküvetten (1 cm Schichtdicke, 4 klare Seiten) überführt und gut durchmischt. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten bei einer Anregungswellenlänge (E_x) von 449 nm, wobei das Maximum der Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge (E_m) von 495 nm lag. Es wurde die SoftMax Pro Datenerfassungs- und Analyse Software verwendet. Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte unter Bezug der zuvor manuell eingestellten OD₆₀₀ (Normalisierung), um die Vergleichbarkeit der Messergebnisse unabhängig von der in den Proben enthaltenen Zellzahl zu gewährleisten.

2.12. Bezugsquellen

Chemikalien ohne besonderen Vermerk wurden von den Firmen Carl Roth & Co. (Karlsruhe), Merck KG (Darmstadt), AppliChem GmbH (Darmstadt), Diagonal (Münster) und Fluka Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) bezogen. In der Regel besaßen sie den Reinheitsgrad „reinst“ oder „zur Analyse“. Gase wurden von der Westfalen AG (Münster) geliefert.

Tab. 2.8: Bezugsquellen Chemikalien

Hersteller	Produkte
Agilent Technologies GmbH, Böblingen	Agilent 7890A, Chromosorb 101, EZChrom <i>Elite</i> , QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
AppliChem GmbH, Darmstadt	EDTA, Acrylamid (40 %, [w/v]), Formaldehyd, RNase A, NBT, BCIP, Erythromycin, Trypton, Hefeextrakt
Biomers GmbH, Ulm	Oligonukleotide
CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Lysozym, IPTG, Agarose, Ethidiumbromid, Brilliant Blue G-250, Brilliant Blue R-250, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, BSA (Albumin Fraktion V)
Difco Laboratories, Hamburg	Agar-Agar
evocatal GmbH	evoglow-Plasmide, evoglow-Antikörper
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	Restriktionsenzyme, Protein Molecular Weight Marker, GeneRuler 1kb DNA Ladder, MassRuler DNA Ladder Mix, dNTP's, SAP, Rapid DNA Ligation Kit
Fluka, Taufkirchen	TEMED
Merck KGaA, Darmstadt	Proteinase K, Chloramphenicol
MP Biomedicals, Eschwege	GeneClean® Turbo Kit
OXOID GmbH, Wesel	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen	<i>Pwo</i> -Polymerase, 10x <i>Pwo</i> Puffer
Roche GmbH, Mannheim	Blocking Reagenz, DIG DNA Labeling Kit, Anti-Digoxigenin AP, Trypton
SGE Analytical Science Pty Ltd, Milton Keynes	GC Autosampler Spritze
SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen	Ampicillin, Thiamphenicol, Oligonukleotide, TEMED, Anti-IgG-Antikörper

Tab. 2.9: Bezugsquellen Geräte und Materialien

Hersteller	Produkte
AMERSHAM Buchler GmbH, Braunschweig	Ultrspec 3000
Analytik Jena AG, Jena	Spekol 1100, Spekol 1200
Biometra GmbH, Göttingen	Power Pack P 25, Mini-Gelkammern, PCR-Cycler, Hybridisierungsöfen, Blotting Apparatur, Nitrocellulosemembran
BIORAD GmbH, München	GenePulser™II
Braun AG, Melsungen	sterile Spritzen
CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Spritzen, Kanülen
Eppendorf AG, Hamburg	Thermomixer comfort, Pipetten, Spitzen, Reaktionsgefäße
Fisher Scientific GmbH, Schwerte	Vortex Gene-2, Bördelkappen, Rollrandgefäße
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	96 Well Platten für Fluoreszenz-messungen
Heraeus Instruments GmbH, Osterode	Biofuge Fresco
Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow	Ultrasonic Processor UP200S
Hitachi	F-4500 Fluorescence Spectrophotometer
Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold	Sorvall RC 5C Plus Zentrifuge, Sigma 3K30 Zentrifuge, Sterilbank Herasafe
Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Lähden-Holte	Anaerobenwerkbänke MACS-MG-500/ MG-1000
Mettler Toledo GmbH, Lähden-Holte	Analysewaage XA205 Dual Range
Molecular Devices	SpectraMaxM2 ^e Plattenreader
Müller & Krempel AG, Bülach	Müller&Krempel Flaschen
New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA	Brutschrank innova 4230
OCHS Laborfachhandel e. K. , Bovende	Hungateröhrchen
Olympus, Hamburg	CH2-Phasenkontrastmikroskop, IX-70-Mikroskop, Olympus BX51
SARSTEDT AG & Co., Nürnberg	Petrischalen , 15 ml-Röhrchen, 50 ml-Röhrchen, Einmalimpfösen, 0,2 µm Sterilfilter, Einmalspatel, 96-Well Reaktionsgefäße, Mikrotiterplatten, Küvetten, Abdeckmatten, Reagenzreservoirs
Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel	Whatman® Papier, Sterilfilter Porengröße 0,2 µm, Nylonmembran
SCHÜTT Labortechnik GmbH, Göttingen	Wasserbad
SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode	Tischkühlzentrifuge Sigma 3K30, Sigma 2-16PK
TECHNE AG, Jahnsdorf	Techne CL-508 UV Illuminator
METTLER TOLEDO GmbH, Giessen	pH Meter Seven Easy

3. Experimente und Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems für den obligaten Anaerobier *Clostridium acetobutylicum*. Dabei galt es zunächst, diese neue molekularbiologische Methode hinsichtlich einer verbesserten Fluoreszenz zu optimieren. Im Anschluss wurde die Anwendbarkeit des Systems anhand detaillierter Promotorstudien im Wildtyp *C. acetobutylicum* ATCC 824 sowie in verschiedenen *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen demonstriert. Zudem konnte innerhalb dieser Arbeit ein induzierbares System als weiteres molekularbiologisches Werkzeug entwickelt werden. Für zukünftige *in vivo* Expressionsstudien im Hochdurchsatz wurde ein geeignetes Protokoll erstellt.

3.1. Etablierung eines FbFP-basierten Reportersystems

Basierend auf kommerziell erhältlichen Flavinmononukleotid (FMN)-basierten Fluoreszenzproteinen (FbFPs) aus den Bakterien *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas putida* (evocatol GmbH, Düsseldorf) wurden synthetische FbFP-Gene mit einer für *C. acetobutylicum* optimierten Codon-Nutzung erstellt und in den Thiolasegen (*thlA*)-Promotor enthaltenen pT-Shuttle-Vektor kloniert (Schulz, 2009). Die resultierenden Konstrukte wurden als pT::P(*thlA*)*bs3* und pT::P(*thlA*)*pp2* bezeichnet und führten sowohl in *Escherichia coli* als auch in *C. acetobutylicum* zu einer messbaren Fluoreszenz, sodass erstmals eine Reporter-gen-vermittelte *in vivo*-Fluoreszenz in *C. acetobutylicum* nachgewiesen wurde (Schulz, 2009). Die Fluoreszenz reichte jedoch nicht aus, um Kolonien auf Agarplatten visuell durch UV-Bestrahlung zu differenzieren. Auch der Versuch, einzelne Zellen der rekombinanten Stämme mittels Fluoreszenzmikroskopie darzustellen, blieb erfolglos. Diese Aspekte sind allerdings für eine potentielle Anwendung des FbFP-basierten Reportersystems, wie z. B. der Analyse von Populationen im Hochdurchsatz (*high-throughput screening*, HTS) essentiell, um eine einfache und schnelle Differenzierung verschiedener Varianten zu gewährleisten. Daher erfolgte zunächst eine Optimierung des *in vivo* Reportersystems, um die Gesamtfluoreszenz zu steigern.

3.1.1. Klonierung und heterologe Expression von FbFPs in *E. coli*

Um eine direkte Gegenüberstellung der Fluoreszenz der bisher verwendeten Reporterproteine Bs1, Bs3 und Pp2 (Schulz, 2009) zu ermöglichen, wurden ergänzend die FbFP-Gene *bs2* und *pp1* in *E. coli* exprimiert. Hierfür erfolgte die Herstellung der Plasmide pT::P(*thlA*)*bs2* und pT::P(*thlA*)*pp1*, die in *E. coli* transformiert und die rekombinanten Stämme anschließend hinsichtlich ihrer Fluoreszenz untersucht wurden.

Bs2 ist eine für die Expression in *E. coli* optimierte Form des Bs1-Proteins. Das Pp1-Protein stammt ursprünglich aus dem Gram-negativen Bakterium *P. putida* und ist ein Derivat des SB2-Blaulichtrezeptors. Zudem enthält es einen Aminosäureaustausch und war Ausgang für die Entwicklung des nachweislich in *C. acetobutylicum* fluoreszierenden Pp2-Proteins. Dieser erste Schritt sollte dem Vergleich aller zu diesem Zeitpunkt verfügbaren FbFPs dienen (FMN-basierte Fluoreszenzproteine; Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Flavin Mononukleotid (FMN)-basierte Fluoreszenzproteine (FbFPs). Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten, relevanten Sauerstoff-unabhängigen FbFP-Proteine. *Light oxygen voltage* (LOV). Aminosäureaustausch durch *site-directed mutagenesis* (Cys62/53Ala Austausch; Cystein (Cys), Alanin (Ala)).

FbFP	Ursprung und Modifikation	Referenz
Bs1	<i>B. subtilis</i> , Derivat von YtvA, Cys62Ala Austausch	Drepper <i>et al.</i> , 2007a „evoglow-Bs1“, evocatal GmbH
Bs2	Bs1 optimiert für <i>E. coli</i> , Nur LOV Domäne (verkürzt)	Drepper <i>et al.</i> , 2007a „evoglow-Bs2“, evocatal GmbH
Bs3	Bs2 optimiert für <i>C. acetobutylicum</i>	Schulz, 2009
Pp1	<i>P. putida</i> , Derivat von SB2, Cys53Ala Austausch	Drepper <i>et al.</i> , 2007a „evoglow-Pp1“, evocatal GmbH
Pp2	Pp1 optimiert für <i>C. acetobutylicum</i>	Schulz, 2009

3.1.1.1. Konstruktion von FbFP-kodierenden Shuttle-Vektoren in *E. coli*

Für die Amplifikation der Gene *bs2* und *pp1* wurden zunächst Oligonukleotide erstellt, welche Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Ssp*DI enthielten (Tab. 2.4). Als Template für die Synthese der FbFP-Gene (2.8.7.2) dienten die kommerziell erhältlichen Plasmide pGLOW-Bs2 und pGLOW-Pp1 (evocatal GmbH, Düsseldorf). Nach Kontrolle der PCR-Amplifikate im Agarosegel schloss sich eine

Aufreinigung an (2.8.5.2.; Abb. 3.1A). Die Fragmente (*bs2* 411 Bp; *pp1* 444 Bp) wurden anschließend mit *Bam*HI und *Ssp*DI restriktiert (2.8.4.1.) und erneut aufgereinigt. Es folgte die Ligation in den entsprechend vorbereiteten Shuttle-Vektor pThyA_{Ca}-C-tag (Girbal *et al.*, 2005). Dieser wurde analog zu den Fragmenten mit *Bam*HI und *Ssp*DI hydrolysiert, wodurch das Fe-Hydrogenasegen (*hydA*) und der *Strep*-Tag entfernt werden konnten. Im Anschluss wurde das 5 kBp-Vektor-Fragment geleluert (2.8.5.3.). Um eine effiziente Ligation zu gewährleisten, erfolgte zur Unterbindung einer möglichen Selbstligation die Dephosphorylierung (2.8.4.2.) des Vektorfragments und eine erneute Aufreinigung. Für die Ligation (2.8.4.3.) wurde der Vektor im Verhältnis von 1:10 und 2:5 mit den *Bam*HI/ *Ssp*DI-restriktierten *bs2*- bzw. *pp1*-Amplifikaten versetzt. Es schloss sich die Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH5α-Zellen an (2.9.3.).

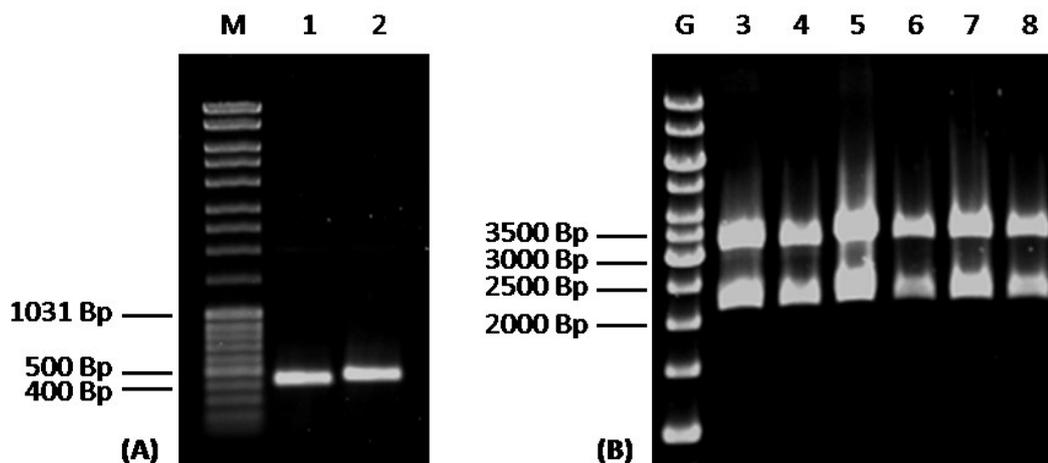


Abb. 3.1: Amplifikation von *bs2* bzw. *pp1* (A) und Kontrollrestriktion von pT::P(*thIA*)*bs2* bzw. pT::P(*thIA*)*pp1* (B). Dargestellt sind 1 %ige [w/v] Agarosegele nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden je 1 µl der gereinigten PCR-Amplifikate (A) bzw. je 2 µl des Restriktionsansatzes (B). **M** MassRuler™ DNA Ladder Mix; **G** GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; **1** *bs2* (411 Bp); **2** *pp1* (444 Bp); Hydrolyse mit *Bam*HI und *Hind*III: **3-5** positive pT::P(*thIA*)*bs2*-Plasmide (2207 Bp und 3212 Bp), **6-8** positive pT::P(*thIA*)*pp1*-Plasmide (2207 Bp und 3245 Bp).

Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte zunächst auf LB-Festmedien unter Ampicillin (100 µg/ml)-Zusatz. Zur Kontrolle der Ligation wurde aus entsprechenden *E. coli*-Übernightkulturen die Plasmid-DNA isoliert (2.8.2.) und einer Doppelrestriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III unterzogen. Wie in Abb. 3.1B dargestellt, zeigten positive Transformanden die durch vorherige *in silico*-Analysen ermittelten Fragmentgrößen von 2,2 kBp und 3,2 kBp (pT::P(*thIA*)*bs2*) bzw. 2,2 kBp und 3,25 kBp

(pT::P(*thIA*)*pp1*). Die korrekte Klonierung der *bs2*- und *pp1*-Fragmente wurde mittels DNA-Sequenzierung (LGC Genomics GmbH, Berlin) verifiziert. Die Vektorkarten von pThyA_{Ca}-C-tag und den erzeugten Plasmiden sind im Anhang dargestellt (Abb. A.1-2).

3.1.1.2. Phänotypische Charakterisierung FbFP-exprimierender *E. coli*-Stämme

Im Anschluss an die erfolgreiche Generierung der FbFP-exprimierenden *E. coli*-Stämme wurden diese hinsichtlich ihrer Fluoreszenz charakterisiert (Abb. 3.2). Hierfür erfolgte die Bestimmung der Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU; 2.11.) aerob angezogener Zellen aus Übernachtskulturen. Um reproduzierbare Werte verschiedener Kulturen zu gewährleisten, wurden die RFU-Daten zur Optischen Dichte (OD₆₀₀) der jeweiligen Zellproben normalisiert. Dies erfolgte ebenfalls in allen nachfolgenden Experimenten. Im Vergleich zur pT-Kontrolle, die ein Plasmid ohne Reporter gen enthielt, wiesen alle FbFP-exprimierenden *E. coli*-Kulturen eine messbare Fluoreszenz auf. Es zeigte sich, dass die Proteine Bs1 und Bs3 die höchste Fluoreszenz in den rekombinanten *E. coli*-Stämmen vermittelten.

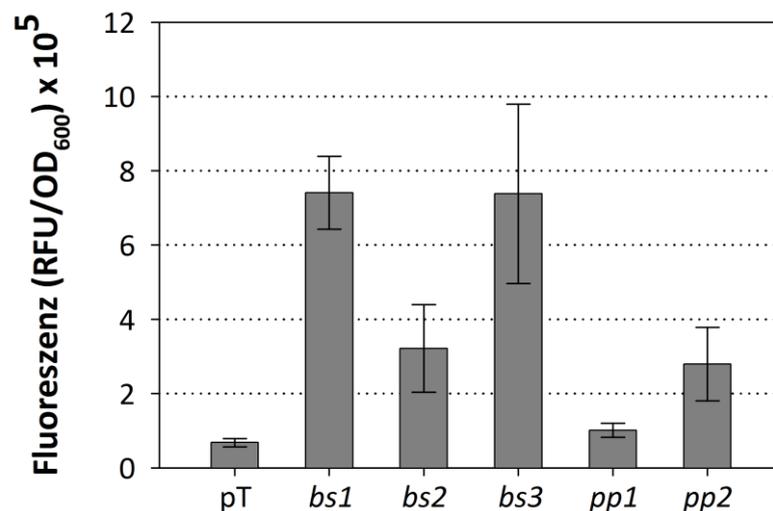


Abb. 3.2: Fluoreszenzmessungen rekombinanter *E. coli*-Stämme. Die rekombinanten Stämme wurden aerob ü. N. bei 37 °C in 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angezogen. Die Messungen erfolgten am HITACHI F-4500 Fluoreszenz Spektrophotometer. Kontrolle (pT); FbFP-exprimierende *E. coli* pT::P(*thIA*)*xy* (*bs1*, *bs2*, *bs3*, *pp1*, *pp2*). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm. n=4.

Für die morphologisch-physiologische Charakterisierung in Bezug auf das Fluoreszenzverhalten der rekombinanten *E. coli*-Stämme wurden Bakterienkolonien nach aerober Anzucht auf LB-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) unter UV-Licht begutachtet (Abb. 3.3A). Die Dokumentation zeigte eine klar erkennbare Fluoreszenz der FbFP-

exprimierenden Stämme im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression der Reporterproteine Bs1, Bs3 und Pp2 führte zur deutlichsten Fluoreszenz.

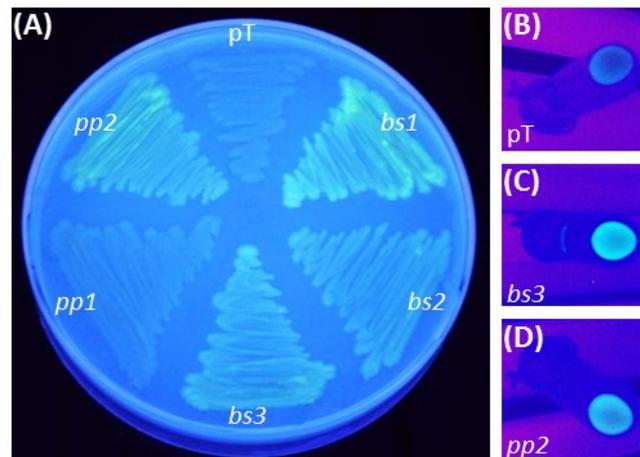


Abb. 3.3: Fluoreszenz FbFP-exprimierender *E. coli*-Zellen auf Festmedium (A) und Zellpellets (B-D) unter UV-Licht. Rekombinante *E. coli*-Zellen wurden auf einer LB-Platte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen, ü. N. bei 37 °C inkubiert und unter UV-Licht fotografiert. Ebenso wurden Zellpellets von 2 ml-Kulturen in Eppendorf Reaktionsgefäßen geerntet, 2x mit PBS-Puffer gewaschen und unter UV-Licht dokumentiert. Kontrolle (pT); FbFP-exprimierende *E. coli* pT::P(*thlA*)*xy* (*bs1*, *bs2*, *bs3*, *pp1*, *pp2*).

Zudem konnte die Fluoreszenz der rekombinanten, mit PBS-Puffer gewaschenen *E. coli*-Zellpellets ebenfalls unter UV-Licht differenziert werden (Abb. 3.3B-D). Hierbei ist zu erwähnen, dass die Zellpellets unter Normallicht eine deutliche Grün-Färbung zeigten.

3.1.2. Heterologe Expression von FbFPs in *C. acetobutylicum*

Im Anschluss an die Konstruktion der FbFP-kodierenden Plasmide in *E. coli* und der Charakterisierung der rekombinanten Stämme bezüglich ihrer Fluoreszenz, folgten Analysen der Reporterproteine in *C. acetobutylicum*. Hierzu wurden die Plasmide zunächst in *E. coli* ER2275 pANII (besitzt eine ϕ 3TI Methyltransferase) methyliert, da das spezifische Restriktionsenzym *Cac824I* in *C. acetobutylicum* eine in *E. coli*-Plasmiden häufig vertretene Erkennungssequenz (5'-GCNGC-3') besitzt (Mermelstein & Papoutsakis, 1993). Die Methylierung der Plasmide wurde mittels *SatI* (*Fnu4HI*)-Testrestriktion überprüft. Es folgte die Elektrotransformation der Konstrukte in *C. acetobutylicum* (2.9.5.). Rekombinante *C. acetobutylicum*-Kolonien wurden durch die Selektion der Plasmid-basierten Erythromycin-Resistenz identifiziert.

3.1.2.1. Proteinnachweis mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die FbFP-Expression rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme sollte durch Detektion einer spezifischen Bande in eindimensionalen SDS-Gelen überprüft werden. Für eine weitere Bestätigung diente der Western Blot als immunologisches Nachweisverfahren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen angezogen, durch Ultraschall aufgeschlossen und die Proteinkonzentrationen bestimmt (2.10.1., 2.10.2.). Anschließend folgte die Separation der Gesamtproteinextrakte mittels SDS-PAGE sowie die Coomassie-Färbung der fixierten Proteine (2.10.3., 2.10.4.). Alternativ wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nylonmembran geblottet und visualisiert, wobei evoglow[®]-Antikörper (evocatal GmbH, Düsseldorf) Anwendung fanden (2.10.5., 2.10.6.).

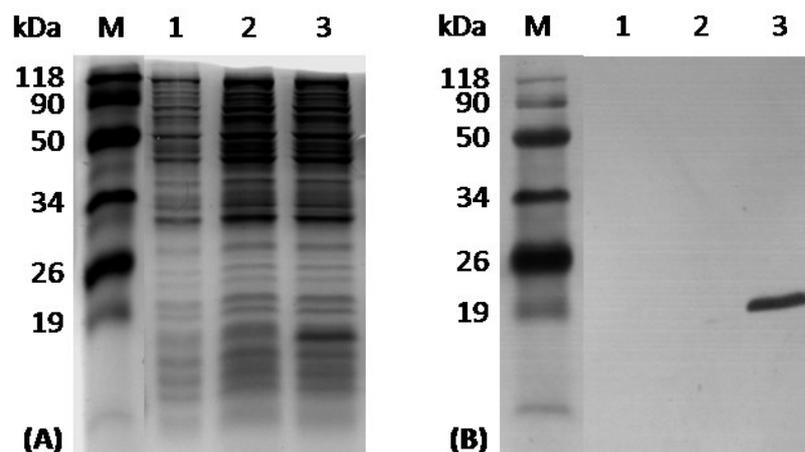


Abb. 3.4: Expression von Pp1 und Pp2 in *C. acetobutylicum*. Dargestellt sind eine 15 %ige SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung (A) und der resultierende Western Blot nach der Detektion (B). Rekombinante Pp-Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert und durch NBT/BCIP-Färbung visualisiert. Es wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtproteinextrakt aufgetragen (ca. 10 µg). **M** Prestained Protein Molecular Weight Marker; **1** pT-Kontrolle; **2** pT::P(*thIA*)pp1; **3** pT::P(*thIA*)pp2.

Abb. 3.4 zeigt den Nachweis der Fluoreszenzproteine Pp1 und Pp2 in den rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämmen. Das ca. 19 kDa große Pp2-Protein aus *C. acetobutylicum* pT::P(*thIA*)pp2 konnte als verstärkte Bande in dem entsprechenden Rohextrakt dargestellt werden (Abb. 3.4A). Die Identifizierung des Pp1-Reporterproteins im SDS-Gel war dagegen nicht eindeutig möglich. Aus diesem Grund folgte die Durchführung eines Western Blots mit evoglow[®]-Antikörpern (evocatal GmbH, Düsseldorf), welcher abermals nur die Expression des Pp2-Proteins bestätigte

(Abb. 3.4B). Auch der Nachweis der Proteine Bs1, Bs2 und Bs3 mittels SDS-PAGE gelang nicht eindeutig (Abb. A.11A), sodass ebenfalls die immunologische Bestätigung durch einen Western Blot angestrebt wurde (Abb. A.11B). Es gelang, eine schwache Bande auf entsprechender Höhe für das Bs3-Protein (ca. 19 kDa) zu visualisieren. Zusammenfassend konnte für die Reporterproteine Bs3 und Pp2 in den entsprechenden *C. acetobutylicum*-Stämmen die Expression belegt werden.

3.1.2.2. Phänotypische Charakterisierung FbFP-exprimierender *C. acetobutylicum*-Stämme

Es folgte die Analyse einer durch die Reporterproteine vermittelten Fluoreszenz in den rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämmen. Hierfür wurden Emissionsspektren von 480-600 nm bei einer Anregungswellenlänge von 449 nm aufgenommen (Abb. 3.5).

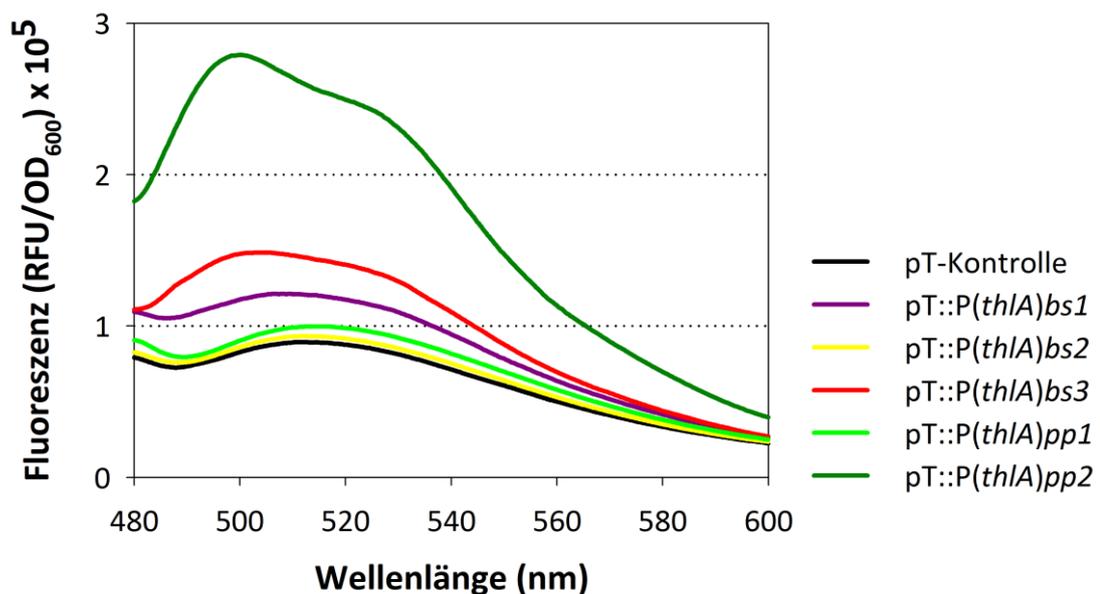


Abb. 3.5: Emissionsspektren rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 10 ml MS-MES (20 µg/ml Erythromycin) angezogen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in der exponentiellen Wachstumsphase und wurden am HITACHI F-4500 Fluoreszenz Spektrophotometer durchgeführt. Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD_{600}). $E_x=449$ nm.

Gut erkennbar sind die, wie vom Hersteller beschriebenen Emissionsmaxima bei 495 nm und ca. 520 nm (evocatal GmbH, Düsseldorf). Im Vergleich zum Kontrollstamm *C. acetobutylicum* pT, der ein Plasmid ohne FbFP-Gen enthält, vermittelte v. a. Pp2 eine gut messbare Fluoreszenz im rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stamm. Die Reporterproteine Bs1 und Bs3 bewirkten ebenfalls eine leichte Erhöhung der

Fluoreszenz der entsprechenden *C. acetobutylicum*-Stämme. Die in dieser Arbeit neu generierten Stämme *C. acetobutylicum* pT::P(*thIA*)*bs2* bzw. *C. acetobutylicum* pT::P(*thIA*)*pp1* zeigten gegenüber den bereits vorhandenen Stämmen keine signifikante Steigerung der Fluoreszenz. Generell konnten die höchsten Fluoreszenz-Werte für die *C. acetobutylicum* Codon-optimierten Varianten Bs3 und Pp2 dargestellt werden.

Parallel zur Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte die anaerobe Anzucht der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme pT::P(*thIA*)*pp1*, pT::P(*thIA*)*pp2*, pT::P(*thIA*)*bs3* und der pT-Kontrolle zusammen auf einer RCA-Agarplatte (20 µg/ml Erythromycin) zur Fluoreszenzanalyse von Kolonien unter UV-Licht bzw. Blaulicht.

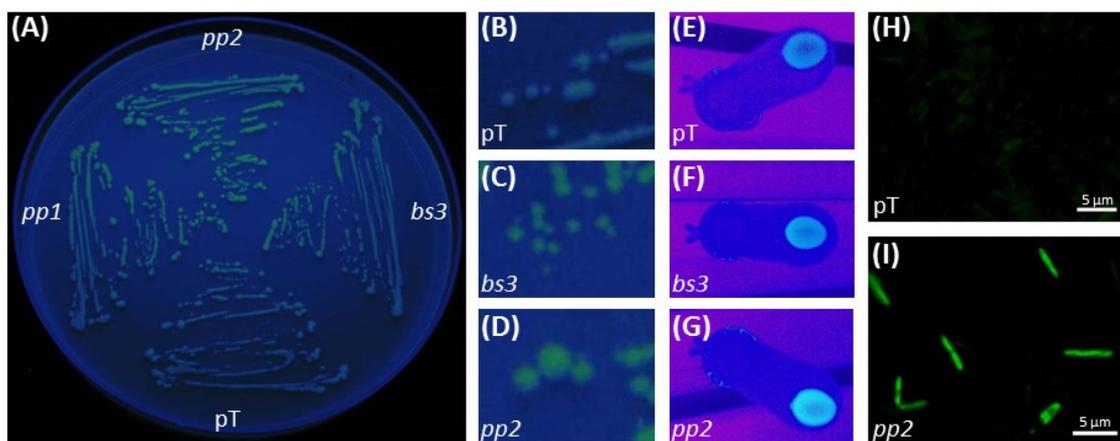


Abb. 3.6: Fluoreszenz FbFP-exprimierender *C. acetobutylicum*-Zellen auf Festmedium unter Blaulicht (A-D), Zellpellets unter UV-Licht (E-G) und Fluoreszenzmikroskopie (H-I). Rekombinante *C. acetobutylicum*-Zellen wurden auf einer RCA-Platte (20 µg/ml Erythromycin) ausgestrichen, anaerob bei 37 °C inkubiert und unter Blaulicht ($E_x=365$ nm) fotografiert. Ebenso wurden Zellpellets von 4 ml-Kulturen (MS-MES) in Eppendorf Reaktionsgefäßen geerntet, 2x mit PBS-Puffer gewaschen und unter UV-Licht dokumentiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden exponentiell wachsende Zellen (10 ml, MS-MES) verwendet. Die Fotos wurden gleichermaßen digital bearbeitet (je A-D und H-I). Kontrolle (pT); FbFP-exprimierende *C. acetobutylicum* pT::P(*thIA*)*xy* (*bs3*, *pp1*, *pp2*).

Da die Begutachtung der Bakterienkolonien unter UV-Licht keinen Unterschied zwischen den Stämmen erkennen ließ, wurden Dokumentationen innerhalb einer „Blaulichtbox“ ($E_x=365$ nm) angefertigt (Abb. 3.6A-D). Der Vergleich der *C. acetobutylicum*-Kolonien zeigte eine signifikante Fluoreszenz, vermittelt durch die Expression des Bs3- und des Pp2-Proteins. Ein ähnliches stammspezifisches Resultat konnte anhand von gewaschenen Zellpellets (PBS-Puffer) entsprechender

C. acetobutylicum-Kulturen unter UV-Licht erzielt werden (Abb. 3.6E-G). Zudem gelang es erstmals, Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen rekombinanter *C. acetobutylicum*-Zellen anzufertigen (Abb. 3.6H-I). Dabei zeigte sich, dass sich v. a. *C. acetobutylicum* pT::P(*thlA*)*pp2* durch eine erkennbare Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle auszeichnete.

3.1.3. Wachstumsphysiologische Fluoreszenz-Optimierung

Im Hinblick auf die unter 3.1.2. erzielten Ergebnisse schlossen sich Untersuchungen zur Optimierung der durch die FbFP-Reporterproteine vermittelten Fluoreszenz in *C. acetobutylicum* an. Hierbei wurde zunächst der Schwerpunkt auf wesentliche wachstumsphysiologische Parameter, wie die Medienzusammensetzung und die Kultivierungsbedingungen gelegt. Das Ziel war die Erstellung eines optimierten Protokolls für reproduzierbare Fluoreszenzmessungen in *C. acetobutylicum*.

3.1.3.1. Einfluss des Kultivierungsmediums auf die FbFP-Expression rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme

Bereits in einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die FbFP-vermittelte Fluoreszenz von *C. acetobutylicum*-Zellen, welche in einem synthetischen Minimalmedium (MS-MES) kultiviert wurden höher lag als bei vergleichbaren Komplexmedium-Kulturen (CGM; Schulz, 2009). Aufbauend auf dieser Erkenntnis sollte der Einfluss von Riboflavin (Vitamin B₂) als Medienzusatz untersucht werden. Dieses Vitamin ist das Vorstufensubstrat für die Synthese von FMN, dem Chromophor des Reporterproteins.

Wie in Abb. 3.7 dargestellt, konnte abermals gezeigt werden, dass die Fluoreszenz rekombinanter *C. acetobutylicum*-Zellen bei Kultivierung in MS-MES im Vergleich zur Kultivierung in CGM gesteigert war. Ebenfalls ersichtlich war eine Erhöhung der FbFP-vermittelten Fluoreszenz bei Zugabe von Riboflavin zum Medium (Abb. 3.7). Die Handhabung des Vitamins wurde jedoch durch dessen geringe Löslichkeit in Wasser für die Herstellung entsprechender Stammlösungen erschwert (65 mg/l bei 20 °C). Zudem konnte eine Rest-Fluoreszenz im Überstand der mehrfach gewaschenen Proben (2.11.) festgestellt werden, die auf das Vorhandensein von Riboflavin zurückzuführen war.

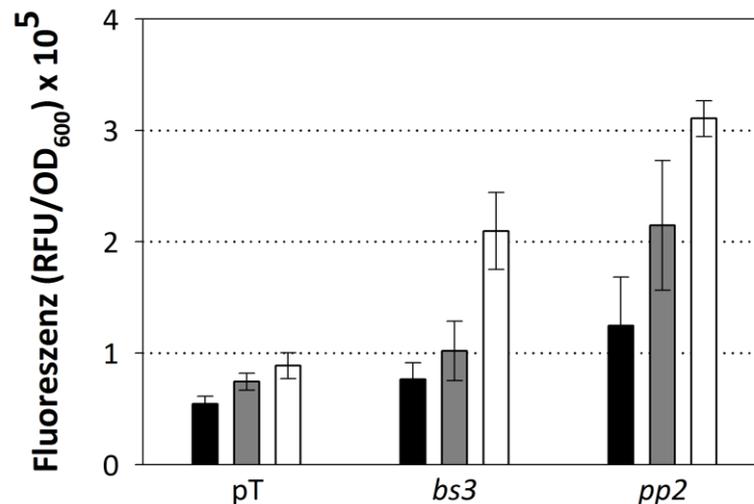


Abb. 3.7: Fluoreszenzmessungen rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme in verschiedenen Medien. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in folgenden Medien mit 20 µg/ml Erythromycin angezogen: CGM (schwarz), MS-MES (grau) und MS-MES + 10 mg/ml Riboflavin (weiß). Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in der exponentiellen Wachstumsphase und wurden am HITACHI F-4500 Fluoreszenz Spektrophotometer durchgeführt. Kontrolle (pT); FbFP-exprimierende *C. acetobutylicum* pT::P(*thIA*)*xy* (*bs3*, *pp2*). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm. n≥3.

Erst kürzlich wurde die eigenständige Bildung von ausreichenden Mengen an Riboflavin in *C. acetobutylicum* bestätigt (Cai & Bennett, 2011), sodass das Vitamin keine Limitierung der FbFP-Synthese darstellte und somit auf den Zusatz während der weiteren Arbeit verzichtet wurde.

3.1.3.2. Temperatureinfluss auf die Fluoreszenz von FbFPs in *C. acetobutylicum*

Für eine mögliche Anwendung der Reporterproteine in thermophilen Mikroorganismen, wie z. B. cellulolytischen Clostridien, war der Aspekt der Temperaturstabilität interessant. Hierfür erfolgten Untersuchungen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen über einen Zeitraum von 30 Minuten (Abb. 3.8). Für diese Analysen wurde der Stamm *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*pp2* (3.2.) verwendet, der die bis dahin höchste messbare Fluoreszenz aufwies.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Pp2-Fluoreszenzproteins bei Inkubationstemperaturen bis 45 °C stabil war. Während der Inkubation bei 50 °C nahm die Fluoreszenz nach 7 Minuten langsam ab. Die Inkubation bei 55 °C zeigte einen starken Abfall der Fluoreszenz nach ebenfalls 7 Minuten, bis diese nach 10 Minuten schließlich noch ca. 50 % aufwies. Zudem wurde ein Stabilitätsexperiment bei Raum-

temperatur durchgeführt, das keinen Abfall der Fluoreszenz über einen Zeitraum von 24 Stunden erkennen ließ.

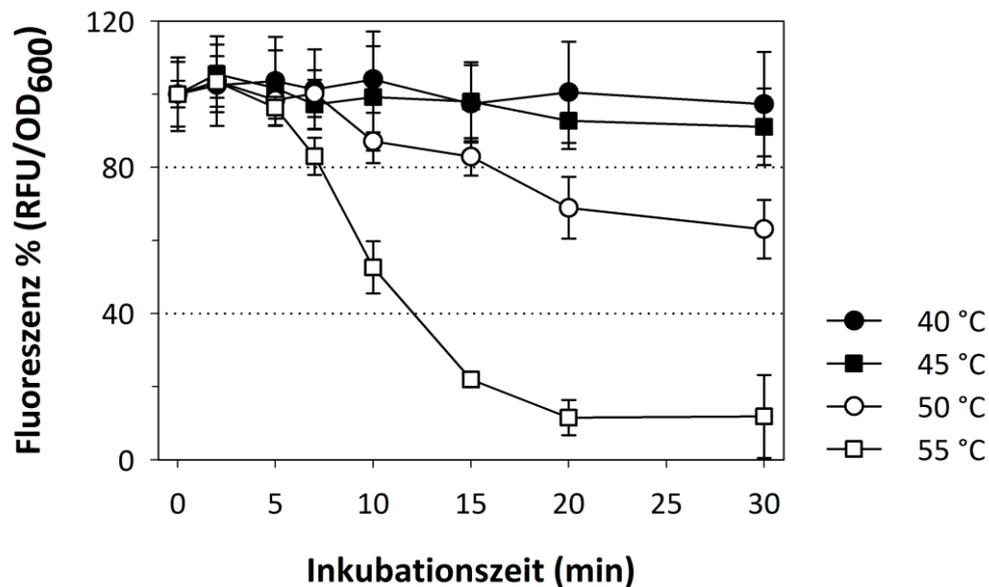


Abb. 3.8: Temperaturstabilität von FbFPs in *C. acetobutylicum*. Der rekombinante *C. acetobutylicum*-Stamm pT::P(*ptb*)*pp2* wurde anaerob bei 37 °C in 50 ml MS-MES (20 µg/ml Erythromycin) bis zum exponentiellen Wachstum (OD_{600} 0,8) angezogen. Vor den Fluoreszenzmessungen wurden die Zellen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Start-RFU wurde auf 100 % gesetzt. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD_{600}). $E_x=449$ nm/ $E_m=495$ nm. $n=3$.

3.1.4. Molekulare Fluoreszenz-Optimierung durch gezielten Aminosäureaustausch

Im Anschluss an die zuvor beschriebenen wachstumsphysiologischen Optimierungen der FbFP-vermittelten Fluoreszenz in *C. acetobutylicum* (3.1.3.) wurde eine Optimierung auf molekularer Ebene angestrebt. Anhand von FbFPs für *E. coli* wurden einige Aminosäurereste des Pp1-Proteins beschrieben, deren Austausch mittels Zufallsmutagenese zu einer erhöhten Fluoreszenz führten (Jentzsch *et al.*, 2009). Bezug nehmend auf diese Mutationsanalysen sollte mittels ortsspezifischer (*site-directed*) Mutagenese die funktionelle Aminosäure Tyrosin an Position 112 (Tyr¹¹²) des Pp2-Proteins gegen die kleine unpolare Aminosäure Alanin ausgetauscht werden. Es schloss sich die Charakterisierung der Fluoreszenz und damit verbunden einer möglichen sensitiveren Differenzierung an.

3.1.4.1. Klonierung und heterologe Expression von Pp3 in *E. coli*

Für den Austausch von Tyr¹¹² des Pp2-Proteins gegen Ala¹¹² wurde im Wesentlichen nach den Vorgaben des QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) vorgegangen (2.8.7.3.). Hierbei erfolgte das Design der Mutageneseprimer (Tab. 2.4) nach der Anforderung, dass sie dieselbe Mutation kodieren, aber zueinander komplementär sind und so jeweils an homologer Position am kodierenden und nicht-kodierenden Strang der Matrizen-DNA binden. Das als Template dienende Plasmid pT::P(*thlA*)*pp2* wurde zuvor aus einem dam⁺ (DNA Adenine Methylase)-methylierenden *E. coli*-Stamm (DH5α) isoliert (2.8.2.). Die PCR erfolgte wie unter 2.8.7.3. beschrieben. Als Ergebnis sollte das Plasmid pT::P(*thlA*)*pp3* mit dem entsprechenden Aminosäureaustausch generiert werden, welches zu diesem Zeitpunkt Einzelstrangbrüche enthielt. Abb. 3.9A zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung solcher PCR-Amplifikate. Eine gelungene Synthese des mutierten Plasmids (pT::P(*thlA*)*pp3*) war an einer zum Template zusätzlichen, höher liegenden Bande (*open circular*) zu erkennen (Spur 3-5).

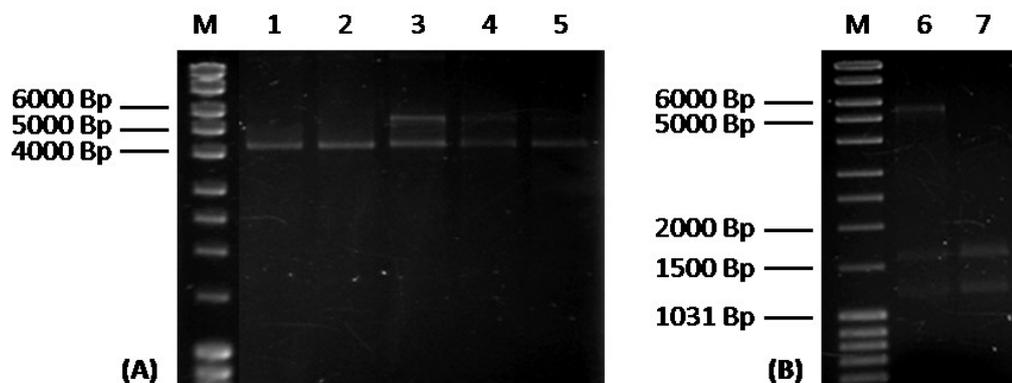


Abb. 3.9: Amplifikation von pT::P(*thlA*)*pp3* (A) und *DpnI*-Testrestriktion (B). Dargestellt sind 1%ige [w/v] Agarosegele nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden je 10 µl. **M** MassRuler™ DNA Ladder Mix; **1-5** PCR-Amplifikate verschiedener Ansätze; Hydrolyse mit *DpnI*: **6** pT::P(*thlA*)*pp3*, **7** pT::P(*thlA*)*pp2* (Template).

Anschließend erfolgte die Hydrolyse des Ansatzes mittels *DpnI*-Endonuklease (Erkennungssequenz: 5`-Gm⁶ATC-3`), um die Selektion der zuvor methylierten Template-DNA und des nicht-methylierten Amplifikats zu ermöglichen (Abb. 3.9B). So konnte gewährleistet werden, dass ausschließlich mutagenisierte Plasmide in *E. coli* transformiert wurden. Es schloss sich die Transformation der zirkulären dsDNA in superkompetente XL1-Blue *E. coli*-Zellen an (2.8.7.3.), in denen die Einzelstrangbrüche des neu ampli-

fizierten Plasmids geschlossen wurden. Nachfolgend konnte aus den mit dieser Methode gewonnenen Klonen die Plasmid-DNA isoliert werden, woraufhin diese zur Bestätigung des Aminosäureaustausches sequenziert wurden (LGC Genomics GmbH, Berlin). Nach positivem Ergebnis erfolgte die Umklonierung des *pp3*-Gens (Tyr¹¹²Ala; 452 Bp) in den Vektor pThyA_{Ca}-C-tag (3.1.1.1.) und die Transformation in *E. coli* DH5 α . Hintergrund für diesen zusätzlichen Schritt war es, mögliche Mutationen im Rest-Plasmid ausschließen zu können.

Im Vergleich zur Pp2-vermittelten Fluoreszenz in *E. coli* (3.1.1.2.) zeigte *E. coli* pT::P(*thlA*)*pp3* keine erhöhte Expression des neu generierten FbFP-Proteins.

3.1.4.2. Heterologe Expression von Pp3 in *C. acetobutylicum*

Das mutagenisierte Plasmid wurde analog zu der unter 3.1.2. beschriebenen Vorgehensweise methyliert und in *C. acetobutylicum* transformiert. Es schloss sich die Charakterisierung der Pp3-vermittelten Fluoreszenz im Vergleich zum ursprünglichen Stamm *C. acetobutylicum* pT::P(*thlA*)*pp2* an (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Vergleich Pp2- und Pp3-basierter Fluoreszenz in *C. acetobutylicum*.

C. acetobutylicum-Zellen wurden in 10 ml CGM bzw. MS-MES (20 μ g/ml Erythromycin) angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm. n \geq 3.

Plasmid	CGM (RFU/OD ₆₀₀)	MS-MES (RFU/OD ₆₀₀)
pT-Kontrolle	15,8 \pm 0,5	10,3 \pm 0,7
pT::P(<i>thlA</i>) <i>pp2</i>	28,2 \pm 8,6	46,8 \pm 5,4
pT::P(<i>thlA</i>) <i>pp3</i>	20,9 \pm 3,6	17,8 \pm 1,0

Wie aus den ermittelten Werten ersichtlich ist, vermittelte das neue rekombinante Protein (Pp3) gegenüber dem Pp2-Protein eine verringerte Fluoreszenz in *C. acetobutylicum*, sodass die Fluoreszenz auf molekularer Ebene als nicht steigerungsfähig eingeschätzt wurde.

3.1.5. Vergleich geeigneter Plasmidserien

Für die Etablierung des anaeroben *in vivo* Reportersystems in *C. acetobutylicum* wurden verschiedene Shuttle-Vektor-Systeme hinsichtlich einer verbesserten Plasmidstabilität und einer dadurch optimierten Fluoreszenz untersucht.

3.1.5.1. pMTL80000-Serie

Eine vor kurzem entwickelte Shuttle-Vektor-Serie stellen die pMTL80000-Plasmide dar (Heap *et al.*, 2009). Das modulare System bietet u. a. die Möglichkeit, verschiedene Replikationsursprünge für Gram-positive Bakterien zu nutzen, welche ebenfalls in anderen Clostridien angewendet werden können. Für diese Arbeit wurden folgende Plasmide (und Replikationsursprünge) verwendet: pMTL82151 (pBP1 aus *C. botulinum*), pMTL83151 (pCB102 aus *C. butyricum*), pMTL84151 (pCD6 aus *C. difficile*) und pMTL85151 (pIM13 aus *B. subtilis*). Alle Plasmide enthielten den ColE1 (*ori*)-Replikationsursprung für die Klonierung bzw. Plasmidreplikation in *E. coli*.

Die Klonierung der FbFP-Gene erfolgte unter Verwendung der *SacI*- und *XbaI*-Restriktionsschnittstellen der MCS (*multiple cloning site*) der Plasmide. Für die Amplifikation des Thiolasegen-Promotors zusammen mit den Reportergenen *bs3* (882 Bp), *pp2* (915 Bp) und *pp3* (915 Bp) wurden die entsprechenden pT-Vektoren als Template verwendet (Schulz, 2009; 3.1.4.1.).

Abb. 3.10 zeigt exemplarisch Amplifikate des Thiolasegen-Promotors und des *pp2*-Gens vom Plasmid pT::P(*thlA*)*pp2* im Agarosegel. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 3.1.1.1. beschriebenen Ablauf. Die Vektorkarten sind im Anhang dargestellt (Abb. A.7-10).

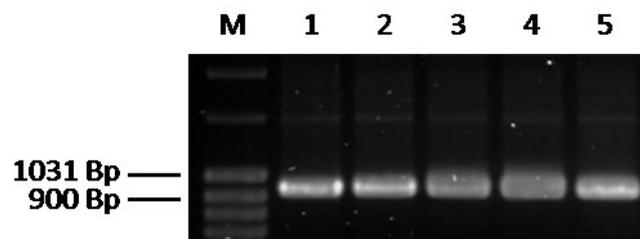


Abb. 3.10: Amplifikation des Thiolasegen-Promotors und des *pp2*-Gens. Dargestellt ist ein 1 %iges [w/v] Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden je 1 μ l PCR-Amplifikat. **M** MassRuler™ DNA Ladder Mix; **1-5** PCR-Fragmente verschiedener Ansätze (915 Bp).

Die Fluoreszenzmessungen (2.11.) der rekombinanten *E. coli*-Stämme belegten im Vergleich zu den Kontrollen (Plasmide ohne Thiolasegen-Promotor und FbFP-Gen) eine FbFP-vermittelte Fluoreszenz (Abb. A.12). Außerdem wiesen die Zellpellets entsprechender Kulturen bereits unter Normallicht eine sichtbare Grün-Färbung auf. Im Anschluss an die Methylierung der Plasmide und die Transformation in *C. acetobutylicum* (2.9.5.) wurden die rekombinanten Stämme hinsichtlich ihrer Fluoreszenz charakterisiert (Abb. 3.11).

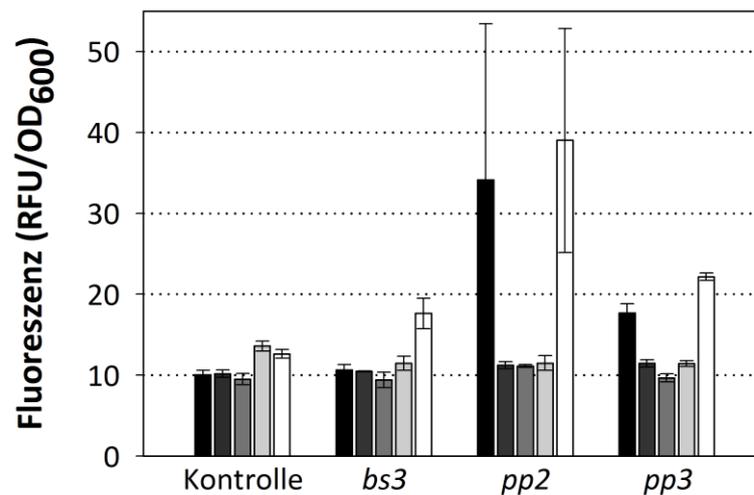


Abb. 3.11: Fluoreszenzvergleich rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme mit Plasmiden der pMTL80000-Serie und der pT-Serie. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 10 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 15 µg/ml Thiamphenicol (pMTL80000) bzw. 20 µg/ml Erythromycin (pT) angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). FbFP (*bs3*, *pp2*, *pp3*)-vermittelte Fluoreszenz. pT (schwarz); pMTL82151 (dunkelgrau); pMTL83151 (mittelgrau); pMTL84151 (hellgrau); pMTL85151 (weiß). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm. n≥3.

Stämme, die Plasmide der Serien pMTL82151, pMTL83151 und pMTL84151 enthielten, zeigten keine signifikanten Unterschiede zur jeweiligen Vektorkontrolle. Die pMTL85151-Serie hingegen vermittelte in *C. acetobutylicum* ähnliche Fluoreszenzwerte, wie die zuvor beschriebene pT-Serie. Es ist ersichtlich, dass die Pp2-basierte Fluoreszenz nicht wesentlich gesteigert werden konnte.

3.1.5.2. pT-Vektor bzw. pTC-Vektor

Bis zu diesem Punkt der Arbeit wurde die pT-Serie verwendet, welche sich vom Shuttle-Vektor pThyA_{Ca}-C-tag (Girbal *et al.*, 2005) ableitet. Dieser zeichnet sich durch den Besitz von Replikationsursprüngen für Gram-negative und Gram-positive

Bakterien, sowie durch das Vorhandensein des nativen *C. acetobutylicum* Thiolasegen (*thlA*)-Promotors aus. Es konnte gezeigt werden, dass unter Einsatz dieses Plasmid-Systems eine messbare Expression von heterologen Fluoreszenzproteinen in *E. coli* (3.1.1.2.) und in *C. acetobutylicum* (3.1.2.2.) stattfand.

Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurde ergänzend der alternative pTChydA_{Ca}-C-tag-Vektor (M. Wietzke, Universität Rostock) genutzt. Dieser leitet sich vom pThydA_{Ca}-C-tag-Vektor ab und zeichnet sich durch den Besitz einer anderen Antibiotika-Resistenz (Chloramphenicol/ Thiamphenicol) aus (Vektorkarte Abb. A.5). Aufbauend auf dieser Eigenschaft bestand die Möglichkeit, spezifische Promotoraktivitäten von *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen zu ermitteln (3.3.).

3.2. Promotorstudien der *thlA*-, *ptb*-, *adc*- und *hydA*-Gene zur Charakterisierung des Reportersystems

Um Aussagen über die Qualität des neu etablierten Fluoreszenz-basierten Reportersystems (3.1.) treffen zu können, sollten im Anschluss systematische Promotoranalysen durchgeführt werden. Für dieses erste Anwendungsbeispiel (*proof of concept*) zur Funktionalität des *in vivo* Reportersystems wurde das *pp2*-Gen mit unterschiedlichen clostridiellen Promotoren kombiniert und die rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme charakterisiert. Neben dem bis dahin verwendeten Thiolasegen (*thlA*)-Promotor sollten weitere native *C. acetobutylicum*-Promotoren, wie der Phosphotransbutyrylasegen (*ptb*-), der Acetoacetat-Decarboxylasegen (*adc*-) und der Hydrogenasegen (*hydA*)-Promotor eingesetzt und hinsichtlich ihrer vermittelten *pp2*-Expression analysiert werden. Die Aktivitäten dieser drei Promotoren wurden bereits durch Enzymaktivität (β -Galaktosidase, β -Glukuronidase)- und Biolumineszenz (Luziferase)-basierte Reportersysteme in *C. acetobutylicum* beschrieben (Tummala *et al.*, 1999; Girbal *et al.*, 2003; Feustel *et al.*, 2004), sodass eine Beurteilung der Qualität des neuen FbFP-Systems im direkten Vergleich möglich war.

3.2.1. Klonierung der clostridiellen Promotoren und Expression in *E. coli*

Ausgehend vom Plasmid pT::P(*thlA*)*pp2*, das in *C. acetobutylicum* zur bisher höchsten messbaren Fluoreszenz führte (3.1.2.), wurde der *thlA*-Promotor mittels Restriktion

aus dem Vektor entfernt und die entsprechenden *ptb*-, *adc*- und *hydA*-Promotorabschnitte eingefügt.

3.2.1.1. Konstruktion von Vektoren zur Expression von Pp2 durch verschiedene clostridielle Promotoren

Die Amplifikation des *ptb*- (472 Bp), des *adc*- (408 Bp) und des *hydA*-Promotors (199 Bp) erfolgte unter Verwendung von Primern, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SacI* und *Bam*HI enthielten (Tab. 2.4). Als Template für die PCR diente genomische DNA von *C. acetobutylicum* (2.8.3.). Die Synthese der Promotorfragmente erfolgte wie unter 3.1.1.1. beschrieben. In Abb. 3.12A ist exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung der *ptb*-Promotor-Fragmente aus verschiedenen PCR-Ansätzen (2.8.7.2.) dargestellt.

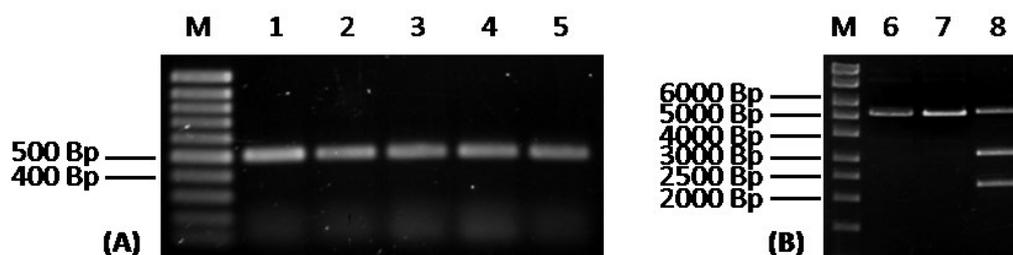


Abb. 3.12: Amplifikation des *ptb*-Promotors (A) und Kontrollrestriktion potentiell positiver pT::P(*adc*)pp2-Plasmide (B). Dargestellt sind 1 %ige [w/v] Agarosegele nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden je 1 μ l. **M** MassRuler™ DNA Ladder Mix; **1-5** PCR-Amplifikate des *ptb*-Promotors (472 Bp); Hydrolyse mit *PstI* und *NdeI*: **6-7** pT::P(*adc*)pp2 (5402 Bp), **8** pT::P(*thIA*)pp2 (5457 Bp, 3197 Bp und 2260 Bp).

An die Aufreinigung der Promotor-Amplifikate schloss sich die Restriktion mit *SacI* und *Bam*HI an (2.8.5.2., 2.8.4.1.). Die weitere Vorgehensweise ist unter 3.1.1.1. erläutert. Im Anschluss erfolgte die Ligation der vorbereiteten Fragmente in den restriktierten Vektor pT::P(*thIA*)pp2, aus dem zuvor der *thIA*-Promotor entfernt wurde. Dabei erfolgte der Einsatz des Vektors (4992 Bp) für die Generierung der Plasmide pT::P(*ptb*)pp2 und pT::P(*adc*)pp2 im Verhältnis von 1:3 und 2:5 mit den entsprechenden Fragmenten. Die Ligation des pT::P(*hydA*)pp2-Plasmids wurde aufgrund des kleinen Promotor-Fragments (199 Bp) im Verhältnis von 1:25 durchgeführt. Es schloss sich die Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (2.9.3.) und die Selektion potentiell positiver Klone auf LB-Platten (100 μ g/ml Ampicillin) an. Eine Kontrollrestriktion unter Verwendung der Enzyme *PstI* und *NdeI* diente der Identi-

fizierung zuvor isolierter (2.8.2.), potentiell positiver Plasmide. Da das Restriktionsenzym *Pst*I nur zu einer Hydrolyse im *thlA*-Promotor führte, sollten Plasmide mit neu inseriertem Promotor lediglich einmal restriktiert werden. Wie beispielhaft für das pT::P(*adc*)*pp2*-Plasmid in Abb. 3.12B dargestellt, zeigten positive Konstrukte nach der Restriktion nur ein Fragment (5402 Bp), wohingegen der Ausgangsvektor pT::P(*thlA*)*pp2* bis zu drei Fragmente aufwies (einfach linearisiert: 5457 Bp; doppelt hydrolysiert: 3197 Bp und 2260 Bp). Die Sequenzierung (LGC Genomics GmbH, Berlin) der rekombinanten Plasmide diente der endgültigen Verifizierung der Ergebnisse. Die Vektorkarten der erzeugten Plasmide sind im Anhang dargestellt (Abb. A.3).

3.2.1.2. Promotor-spezifische Pp2-Expression in *E. coli*

Die Fluoreszenzspektren (480 nm bis 600 nm) der rekombinanten *E. coli*-Stämme sind in Abb. 3.13 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die nativen *C. acetobutylicum*-Promotoren deutlich unterschiedliche Aktivitäten in *E. coli* aufwiesen.

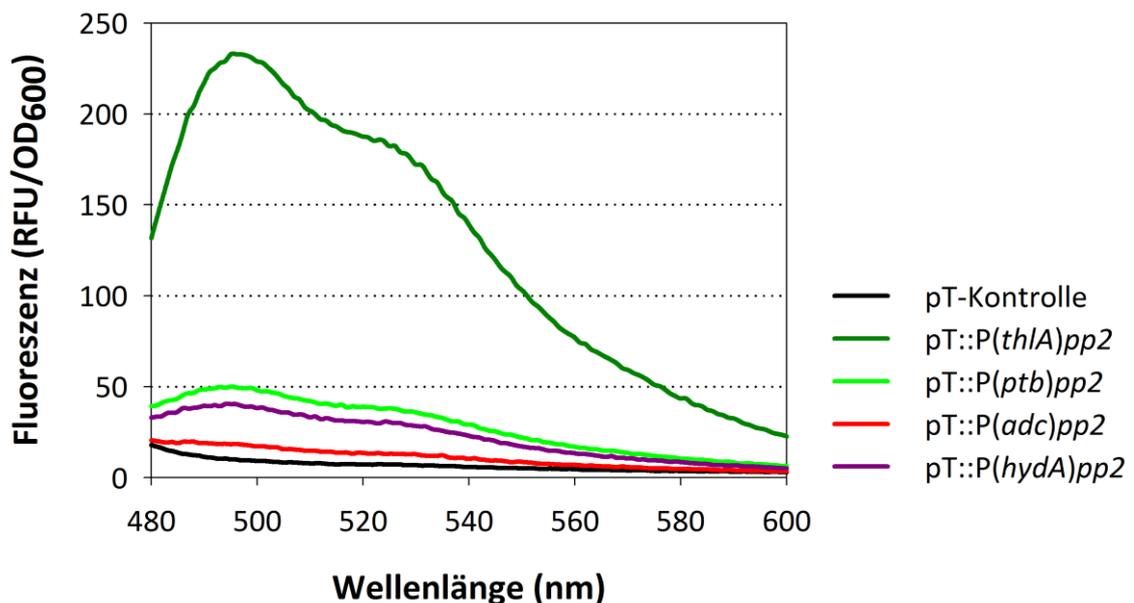


Abb. 3.13: Emissionsspektren Promotor-spezifischer Pp2-Expression in *E. coli*. Die rekombinanten Stämme wurden aerob ü. N. bei 37 °C in 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm.

Im Vergleich zur *thlA*-Promotor-vermittelten Pp2-Fluoreszenz wies der *ptb*-Promotor eine ca. 21 %ige und der *hydA*-Promotor eine ca. 17 %ige Aktivität auf (E_m=495 nm).

Der *adc*-Promotor bewirkte gegenüber der pT-Kontrolle (Plasmid ohne Reportergen) eine kaum messbare Expression des Pp2-Proteins in *E. coli*.

3.2.2. Aktivitätsbestimmungen der Promotoren in *C. acetobutylicum*

Zur *in vivo*-Analyse der Promotoraktivitäten in *C. acetobutylicum* wurden die neu generierten Konstrukte methyliert und anschließend in *C. acetobutylicum* transformiert (2.9.5.). Es schloss sich eine Selektion der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme durch die Plasmid-vermittelte Erythromycin-Resistenz an.

3.2.2.1. Promotor-spezifische Pp2-Expression in *C. acetobutylicum*

Zunächst wurden die als positiv identifizierten *C. acetobutylicum*-Stämme im kleinen Maßstab (10 ml-Kulturen) hinsichtlich einer Promotor-vermittelten Pp2-Fluoreszenz untersucht (Abb. 3.14).

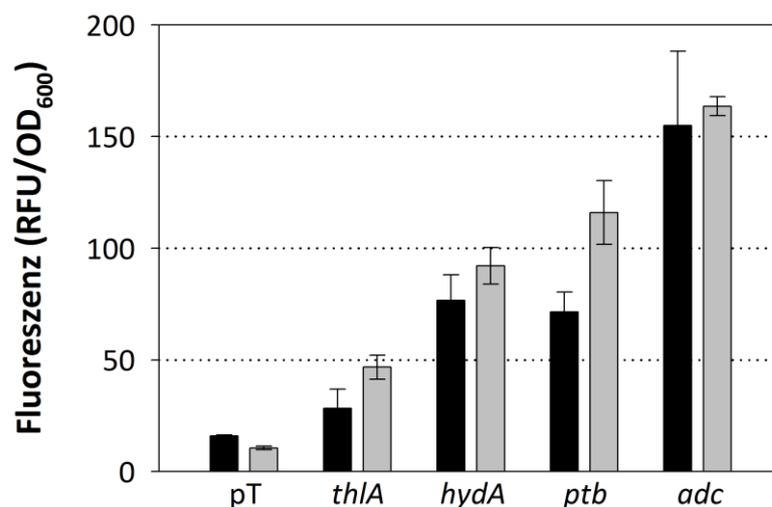


Abb. 3.14: Vergleich verschiedener *in vivo* *C. acetobutylicum*-Promotoraktivitäten mittels Pp2-Fluoreszenz. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 10 ml CGM (schwarz) bzw. MS-MES (grau) mit 20 µg/ml Erythromycin angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Kontrolle (pT); Promotor (*thIA*, *hydA*, *ptb*, *adc*)-vermittelte Pp2-Fluoreszenz in *C. acetobutylicum*. Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm. n≥3.

Im Vergleich zur *thIA*-Promotor-basierten Fluoreszenz führte die Expression des *pp2*-Reportergens unter Kontrolle der hier untersuchten clostridiellen Promotoren zu einer signifikanten Steigerung. Prozentual zeigte der *hydA*-Promotor eine um ca. 97 %, der *ptb*-Promotor eine um ca. 148 % und der *adc*-Promotor eine um ca. 250 % erhöhte Aktivität im Vergleich zum *thIA*-Promotor (Mittelwerte, MS-MES). Ebenfalls gut

erkennbar ist die höhere Aktivität bei Kultivierung der Stämme in Minimalmedium (MS-MES), wie bereits unter 3.1.3.1. beschrieben.

3.2.2.2. Wachstumsabhängige Aktivität der Promotoren in *C. acetobutylicum*

Zur näheren Charakterisierung des Fluoreszenzverhaltens der neuen Stämme wurden Wachstumsversuche durchgeführt (Abb. 3.15). Hierfür wurden die rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme in 200 ml Minimalmedium (MS-MES) unter Zusatz von 20 µg/ml Erythromycin kultiviert und die wachstumsabhängigen Promotoraktivitäten *in vivo* analysiert.

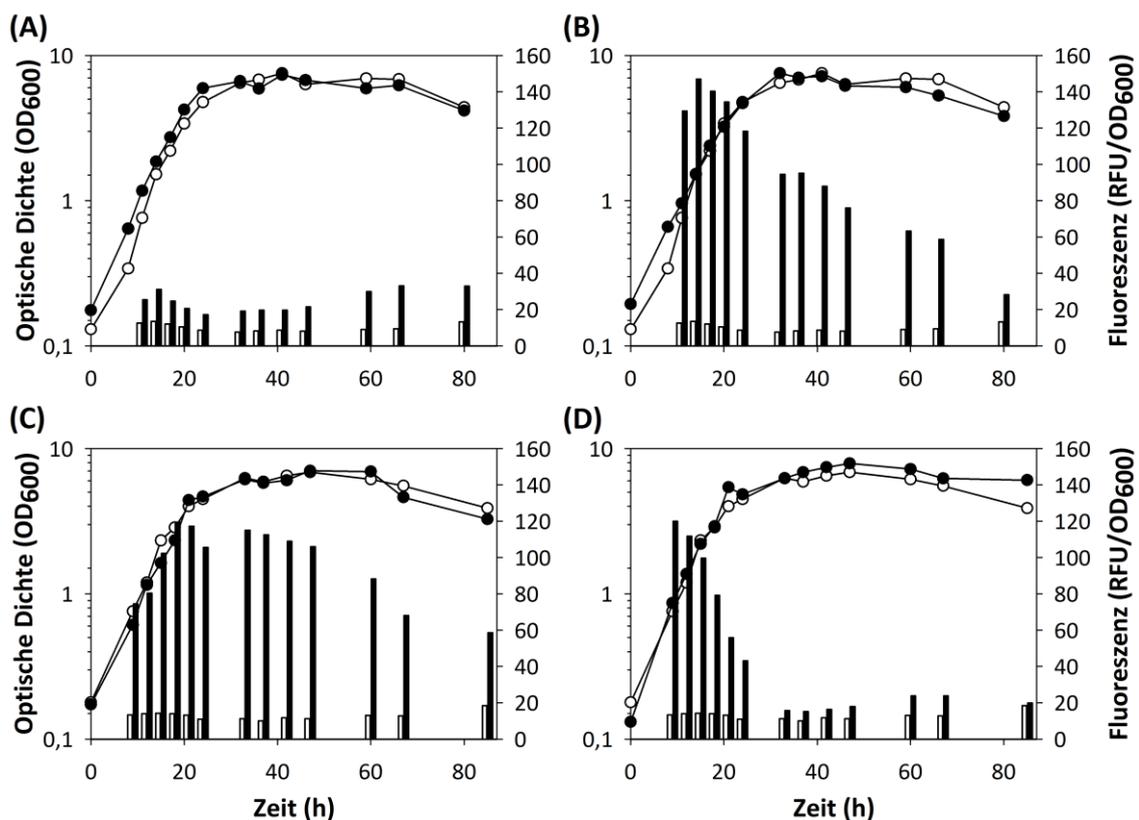


Abb. 3.15: *In vivo* FbFP-Expression in *C. acetobutylicum* vermittelt durch den *thIA*- (A), *ptb*- (B), *adc*- (C) und *hydA*-Promotor (D). Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 200 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 20 µg/ml Erythromycin angezogen. Das Wachstum wurde durch Messung der Optischen Dichte (OD_{600}) verfolgt. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Es sind repräsentative Daten von mindestens zwei Replikaten dargestellt. Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). ○ OD_{600} pT-Kontrolle; □ RFU pT-Kontrolle; ● OD_{600} pT::P(xy)pp2; ■ RFU pT::P(xy)pp2. $E_x=449$ nm/ $E_m=495$ nm.

Die Pp2-basierten Fluoreszenzmaxima der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme waren im Vergleich zum Kontrollstamm (pT) signifikant erhöht. Des Weiteren konnten

beachtliche Unterschiede der spezifischen Promotoraktivitätsprofile dargestellt werden (Abb. 3.15).

So zeigte der *thlA*-Promotor während der exponentiellen Wachstumsphase einen langsamen Anstieg und anschließend eine nahezu konstante Aktivität während der weiteren Kultivierung. Ein auffallendes Maximum konnte nicht dargestellt werden. Im Vergleich zu den anderen Promotoren wies der *thlA*-Promotor die geringste Aktivität auf (Abb. 3.15A). Die durch den *ptb*-Promotor vermittelte *pp2*-Expression führte hingegen zur bisher höchsten gemessenen Fluoreszenz in rekombinanten *C. acetobutylicum*-Zellen (Abb. 3.15B). Während des exponentiellen Wachstums stieg die Fluoreszenz drastisch an, um danach langsam mit Beginn der stationären Wachstumsphase abzufallen. Das Aktivitätsmaximum des *ptb*-Promotors wurde kurz vor Beginn der Butyrat-Produktion erreicht. Für den *adc*-Promotor wurde in dieser Arbeit ein Aktivitätsmaximum in der späten exponentiellen Wachstumsphase, sowie ein gleichbleibendes Aktivitätslevel während der Lösungsmittelphase bis zur Lyse der Zellen beobachtet (Abb. 3.15C). Zudem konnte eine deutliche Promotoraktivität bereits während der Säurephase dargestellt werden. Während der Charakterisierung der *hydA*-Promotoraktivität konnte ein Maximum zu Beginn des exponentiellen Wachstums gezeigt werden (Abb. 3.15D). Anschließend wurde ein drastischer Aktivitätsabfall bis zur frühen stationären Phase beobachtet und auch während der Lösungsmittelphase war die Aktivität sehr gering. Für den *hydA*-Promotor ließ sich somit eine Assoziation mit der frühen Säurephase demonstrieren. Die wachstumsabhängigen Produktspektren aller Stämme sind im Anhang (Abb. A.13) detailliert dargestellt.

3.2.2.3. Kolonie- und Zellmorphologische Charakterisierung der Promotor-spezifischen Pp2-Expression in *C. acetobutylicum*

Die phänotypische Charakterisierung der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme wurde auch morphologisch durchgeführt (Abb. 3.16). Eine klar erkennbare Fluoreszenz der Pp2-exprimierenden Stämme konnte unter Blaulicht ($E_x=365\text{ nm}$) während des Wachstums auf Festmedien dokumentiert werden (Abb. 3.16A). Kolonien von *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*pp2* zeigten dabei die deutlichste Fluoreszenz im Vergleich zu den anderen Stämmen. Zudem konnte die Fluoreszenz der rekombinanten, mit PBS-Puffer gewaschenen und resuspendierten *C. acetobutylicum*-Zellen unter UV-Licht

differenziert werden (Abb. 3.16H). Es wurde eine höhere Fluoreszenz von in definiertem Minimalmedium (MS-MES) angezogenen Bakterien, im Vergleich zu in Komplexmedium (CGM) angezogenen Zellen, gezeigt.

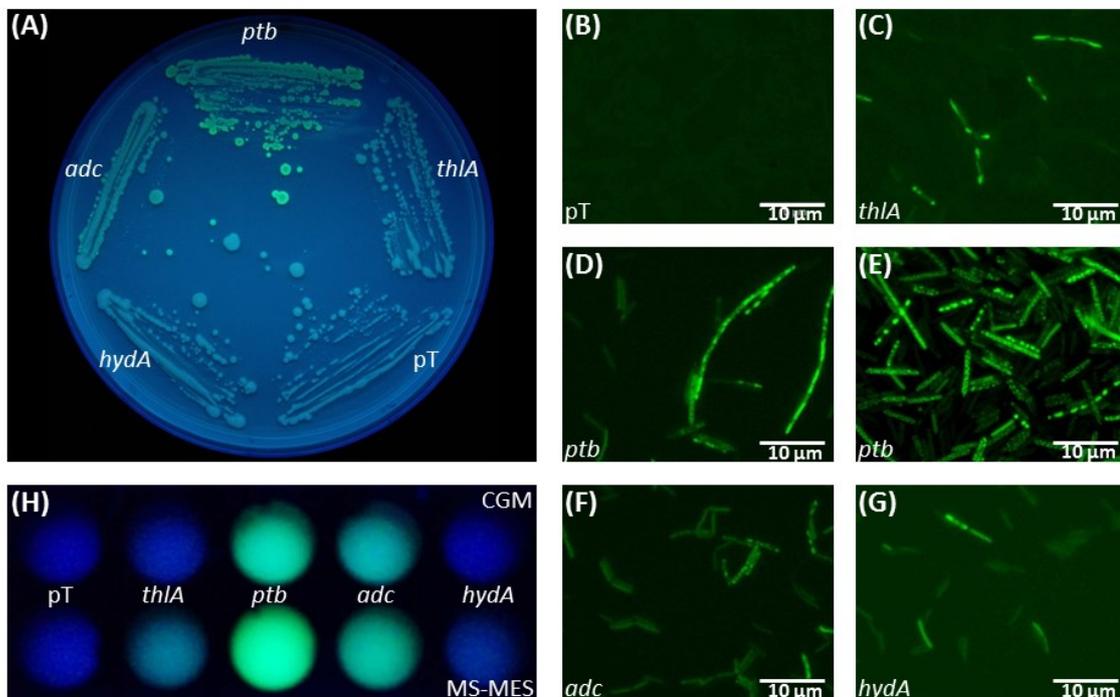


Abb. 3.16: Fluoreszenz FbFP-exprimierender *C. acetobutylicum*-Zellen auf Festmedium unter Blaulicht (A), Fluoreszenzmikroskopie (B-G) und Zellsuspensionen unter UV-Licht (H). Rekombinante *C. acetobutylicum*-Zellen wurden auf einer RCA-Platte (20 µg/ml Erythromycin) ausgestrichen und nach 48 h anaerober Kultivierung unter Blaulicht ($E_x=365$ nm) fotografiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden exponentiell wachsende Zellen (10 ml, MS-MES) verwendet. Ebenso wurden 250 µl gewaschener, resuspendierter (PBS-Puffer) Zellen in 96-Well Fluoreszenz-Mikrotiterplatten unter UV-Licht dokumentiert. Die Fotos wurden gleichermaßen digital bearbeitet (B-D und F-G). Kontrolle (pT); Promotor-vermittelte (*thIA*, *ptb*, *adc*, *hydA*) Pp2-Fluoreszenz in *C. acetobutylicum*.

Des Weiteren erfolgte die Durchführung Fluoreszenz-mikroskopischer Untersuchungen, die ebenfalls eine klar erkennbare Fluoreszenz der Pp2-exprimierenden *C. acetobutylicum*-Stämme erkennen ließen (Abb. 3.16B-G). Es konnte eine veränderte Morphologie (längere Zellen) des Pp2-exprimierenden Stammes unter Kontrolle des *ptb*-Promotors gezeigt werden (Abb. 3.16D-E).

3.3. Expressionsanalysen des *adhE2*-Promotors in verschiedenen *C. acetobutylicum*-Stämmen

Als weiteres Anwendungsbeispiel für das neu etablierte *in vivo* Reportersystem (3.1.) sollte dessen Funktion in *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen dargestellt werden. Diese Stämme wurden mit Hilfe des Clostron®-Systems durch Einfügen eines Gruppen-II-Introns in spezifische Zielgene erstellt, um definierte Gene zu inaktivieren (Heap *et al.*, 2010).

Interessant war dabei die Charakterisierung des nativen Aldehyd/ Alkohol-Dehydrogenasegen (*adhE2*)-Promotors aus *C. acetobutylicum*. Es konnte gezeigt werden, dass *C. acetobutylicum* als einziges bisher bekanntes Bakterium eine zweite bifunktionale Aldehyd/ Alkohol-Dehydrogenase besitzt (Fontaine *et al.*, 2002). Für den *adhE2*-Promotor wurde eine ausschließliche Aktivität in *C. acetobutylicum*-Kulturen beschrieben, die sich in einer sog. „alkoholischen“ Phase befinden (Fontaine *et al.*, 2002). In dieser Phase werden zwar Butanol und Ethanol, nicht aber Aceton, gebildet, während die Zellen in einer kontinuierlichen Kultur bei einem neutralen pH-Wert des Mediums und einer hohen intrazellulären NAD(P)H-Konzentration wachsen. Interessanterweise konnte in diesem Zustand nachgewiesen werden, dass entsprechende Enzyme für die Butanol-Bildung (BdhA, BdhB, AdhE1) nicht exprimiert werden, obwohl Butanol produziert wird. Weitere Analysen der AdhE2 zeigten, dass diese eine Butyraldehyd-/ Butanol-Dehydrogenaseaktivität besitzt, sodass eine maßgebliche Rolle für die Butanol-Synthese in der „alkoholischen“ Phase postuliert wurde (Fontaine *et al.*, 2002).

Im Verlauf dieser Arbeit konnte für die Fluoreszenz-basierte Analyse der *adhE2*-Promotoraktivität neben dem Wildtyp *C. acetobutylicum* ATCC 824 u. a. der Integrationsstamm *C. acetobutylicum* *rex::int(95)* (Wietzke & Bahl, 2012) verwendet werden. Dabei handelt es sich um einen Stamm, in dem das Gen für ein putatives *redox-active protein* ausgeschaltet wurde. Erste Untersuchungen zeigten, dass die Aktivitäten einiger Enzyme gesteigert waren (Thiolase, Crotonase, Aldehyd/ Alkohol-Dehydrogenase). Dabei stand die nachweislich dereprimierte AdhE2-Aktivität von *C. acetobutylicum* *rex::int(95)* im Kontrast zur Aktivität im *C. acetobutylicum* Wildtyp. Die Aktivität des *adhE2*-Promotors sollte zudem parallel in den Integrationsstämmen *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* (Lehmann & Lütke-

Eversloh, 2011; Lehmann *et al.*, 2012b) analysiert werden. Diese Stämme zeichnen sich im Vergleich zum Wildtyp durch ein Defizit in der Buttersäure-Synthese und eine hohe Ethanol-Produktion aus. Interessanterweise zeigte *C. acetobutylicum rex::int(95)* ebenfalls eine reduzierte Buttersäure- und signifikant erhöhte Ethanol-Bildung, sodass drei unterschiedliche Integrationsstämme mit analogen Produktspektren für diese Arbeit zur Verfügung standen. Es wurde vermutet, dass dieser „ethanogene“ Phänotyp möglicherweise auf eine gesteigerte AdhE2-Expression zurückzuführen ist.

3.3.1. Klonierung des clostridiellen *adhE2*-Promotors

Da zur Herstellung der Integrationsstämme eine Erythromycin-Resistenzkassette in das jeweilige Zielgen eingefügt wurde, konnte der bisher verwendete pT-Vektor nicht genutzt werden, da dieser ebenfalls eine Erythromycin-Resistenz enthält. Wie bereits unter 3.1.5.2. beschrieben, bestand jedoch die Möglichkeit den alternativen pTChydA_{Ca}-C-tag-Vektor zu verwenden, welcher sich vom pT-Vektor ableitet und eine Chloramphenicol-/ Thiamphenicol-Resistenz vermittelt (Vektorkarte Abb. A.5).

3.3.1.1. Konstruktion von pTC::P(*adhE2*)*pp2* zur *adhE2*-Promotor-kontrollierten Pp2-Expression

Im Vorfeld der Konstruktion des Pp2-exprimierenden Plasmids unter Kontrolle des *adhE2*-Promotors erfolgte zunächst die Integration des *pp2*-Gens unter Kontrolle des *thIA*-Promotors in den pTChydA_{Ca}-C-tag-Vektor (vgl. 3.1.5.1.).

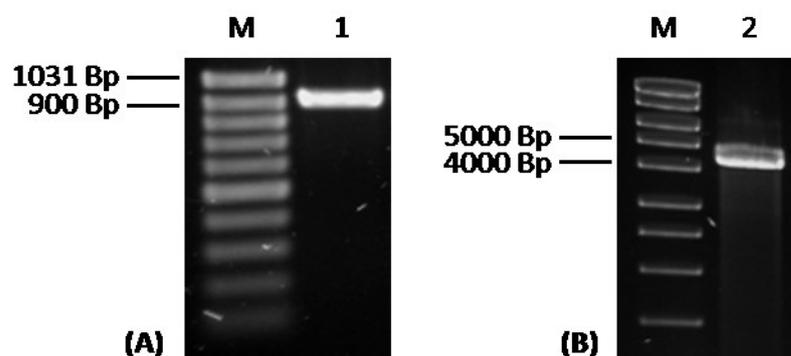


Abb. 3.17: Geleluate des P(*thIA*)*pp2*- (A) und des pTC-Vektorfragments (B). Dargestellt sind 1 %ige [w/v] Agarosegele nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden je 1 μ l. **M** MassRuler™ DNA Ladder Mix; **1** P(*thIA*)*pp2*-Fragment (915 Bp); **2** pTC-Vektorfragment (4427 Bp).

Das Genfragment (915 Bp) konnte mittels Restriktion (2.8.4.1.) des Plasmids pT::P(*thIA*)*pp2* (Schulz, 2009) durch die Enzyme *SacI* und *SspDI* gewonnen werden. Nach Aufreinigung (2.8.5.2.) des Reaktionsansatzes (Abb. 3.17A) erfolgte die Ligation (Verhältnis 1:1 und 1:3) in den vorbereiteten pTChydA_{Ca}-C-tag-Vektor (4427 Bp). Aus diesem wurden im Vorfeld der enthaltene *thIA*-Promotor, das *hydA*-Gen und der Strep-Tag entfernt (*SacI*-/*SspDI*-Restriktion; Abb. 3.17B). Wie unter 3.1.1.1. dargestellt, folgte die Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen bis hin zur abschließenden Sequenzierung potentiell positiver Plasmide (LGC Genomics GmbH, Berlin). Das rekombinante Plasmid (pTC::P(*thIA*)*pp2*) konnte als Positiv-Kontrolle in *C. acetobutylicum* verwendet werden (3.3.2.). Die Vektorkarte ist im Anhang dargestellt (Abb. A.6).

Die Klonierung des *adhE2*-Promotors (332 Bp) in den pTC::P(*thIA*)*pp2*-Vektor wurde wie unter 3.2.1.1. beschrieben durchgeführt. In Abb. 3.18A ist exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung der *adhE2*-Promotor-Fragmente aus verschiedenen PCR-Ansätzen (2.8.7.2.) dargestellt.

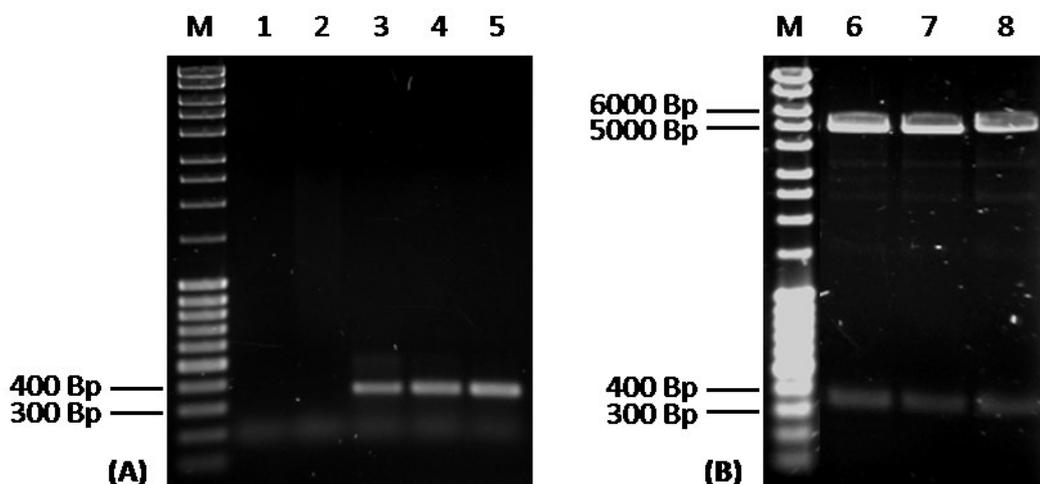


Abb. 3.18: Amplifikation des *adhE2*-Promotors (A) und Kontrollrestriktion von pTC::P(*adhE2*)*pp2* (B). Dargestellt sind 1%ige [w/v] Agarosegele nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden je 1 μ l. **M** MassRulerTM DNA Ladder Mix; **1-5** PCR-Amplifikate des *adhE2*-Promotors (332 Bp); **6-8** Hydrolyse von pTC::P(*adhE2*)*pp2* mit *SacI* und *Bam*HI (4868 Bp und 332 Bp).

Für die Ligation (2.8.4.3.) des Plasmids pTC::P(*adhE2*)*pp2* wurde der Vektor (4868 Bp) im Verhältnis von 1:10 und 1:20 mit dem Fragment versetzt. Aus den im Anschluss an die Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen potentiell positiv selektier-

ten Klonen wurden die Plasmide isoliert und einer Kontrollrestriktion mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *BamHI* unterzogen (3.2.1.1.). Wie in Abb. 3.18B dargestellt, wiesen positive Plasmide nach der Restriktion ein 332 Bp-Fragment (*adhE2*-Promotor) auf. Es schloss sich die Sequenzierung (LGC Genomics GmbH, Berlin) der rekombinanten Plasmide zur endgültigen Verifizierung an (Vektorkarte Abb. A.6).

3.3.1.2. *adhE2*-Promotor-vermittelte Pp2-Expression in *E. coli*

Im Anschluss an die Generierung der rekombinanten Stämme folgten zunächst Untersuchungen zu einer durch die clostridiellen Promotoren vermittelten Pp2-Fluoreszenz in *E. coli*. Hierfür wurden Emissionsspektren von 480-600 nm ($E_x=449$ nm) aufgenommen (Abb. 3.19). Die Promotoren der *thIA*- und *adhE2*-Gene vermittelten in den rekombinanten *E. coli*-Stämmen eine zur pTC-Kontrolle (Plasmid ohne Promotor und Reporter gen) signifikant erhöhte Pp2-basierte Fluoreszenz.

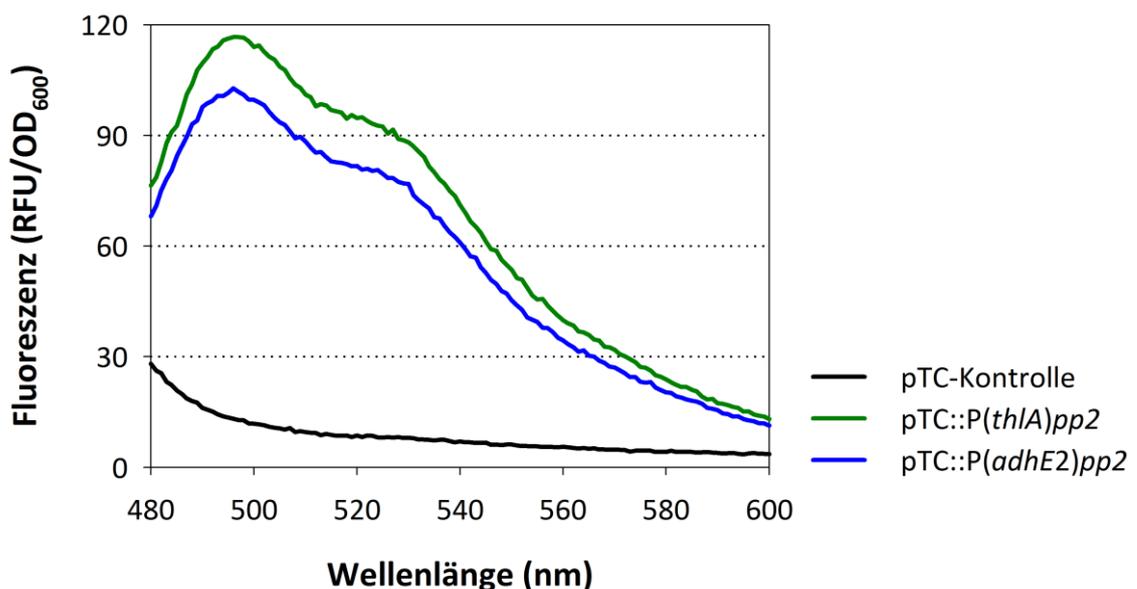


Abb. 3.19: Emissionsspektren rekombinanter *E. coli*-Stämme (pTC-Vektor). Die rekombinanten Stämme wurden aerob ü. N. bei 37 °C in 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD_{600}). $E_x=449$ nm.

Ebenfalls ersichtlich war eine hohe Aktivität des *adhE2*-Promotors im Vergleich zu den bisher charakterisierten *C. acetobutylicum*-Promotoren in *E. coli* (3.2.1.2.). Die Expression des Pp2-Reporterproteins unter Kontrolle des *thIA*-Promotors zeigte eine Abhängigkeit vom gewählten Vektor-System. So wies der in das pTC-Plasmid integrierte

Promotor in *E. coli* eine ca. 50 %ig geringere Aktivität als unter Verwendung des pT-Vektors auf ($E_m=495$ nm; Abb. 3.13).

3.3.2. Aktivitätsbestimmungen des *adhE2*-Promotors in *C. acetobutylicum* *rex::int(95)*, *ptb::int(87)* und *hbd::int(69)* im Vergleich zum Wildtyp

Es schloss sich die *in vivo*-Analyse der Promotoraktivitäten in *C. acetobutylicum* an. Hierfür wurden die neu generierten Konstrukte zunächst methyliert und anschließend in die verschiedenen *C. acetobutylicum*-Integrationsstämme transformiert (2.9.5.). Die Selektion der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme erfolgte durch die Plasmid-vermittelte Thiamphenicol-Resistenz.

3.3.2.1. *adhE2*-Promotor-vermittelte Pp2-Expression im Wildtyp von *C. acetobutylicum* und verschiedenen Integrationsstämmen

Die Fluoreszenzmessungen (2.11.) der spezifischen *thIA*- und *adhE2*-Promotoraktivitäten der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme sind in Abb. 3.20 dargestellt.

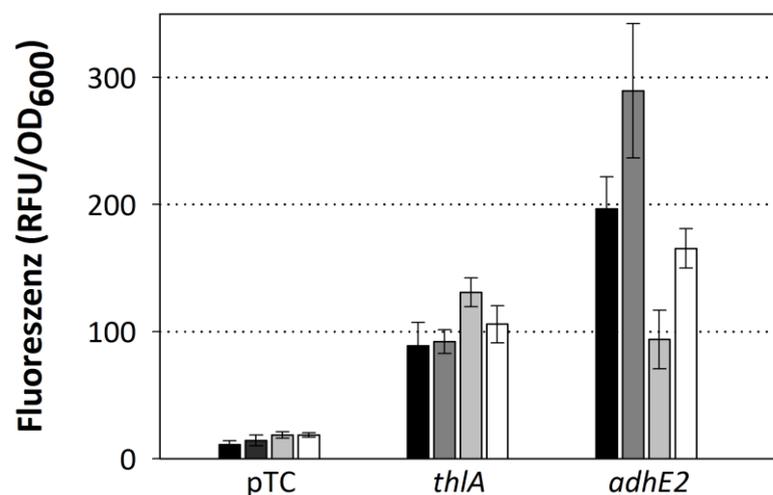


Abb. 3.20: Gegenüberstellung der *thIA*- und *adhE2*-Promotoraktivität in verschiedenen *C. acetobutylicum*-Stämmen mittels Pp2-Fluoreszenz. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 10 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 15 µg/ml Thiamphenicol bzw. 20 µg/ml Erythromycin (Integrationsstämme) angezogen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in der exponentiellen Wachstumsphase und wurden am SpectraMaxM2[®] Spektrophotometer (Molecular Devices) durchgeführt. Kontrolle (pTC); Promotor (*thIA*, *adhE2*)-vermittelte Pp2-Fluoreszenz in *C. acetobutylicum*: Wildtyp (schwarz); *rex::int(95)* (dunkelgrau); *ptb::int(87)* (hellgrau); *hbd::int(69)* (weiß). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD_{600}). $E_x=449$ nm/ $E_m=495$ nm. $n \geq 3$.

Mittels Fluoreszenz-basiertem Reportersystem ließ sich eine signifikant dereprimierte *adhE2*-Promotoraktivität von *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zum *C. acetobutylicum* Wildtyp belegen. Eine gesteigerte *thIA*-Promotoraktivität dieses Stammes war nicht nachweisbar. Für die Integrationsstämme *C. acetobutylicum ptb::int(87)* und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* konnte keine gesteigerte Aktivität des *adhE2*-Promotors dargestellt werden (Abb. 3.20).

In Abb. 3.21 ist eine „Momentaufnahme“ der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme dargestellt, die gegen Ende der Charakterisierungen angefertigt wurde.

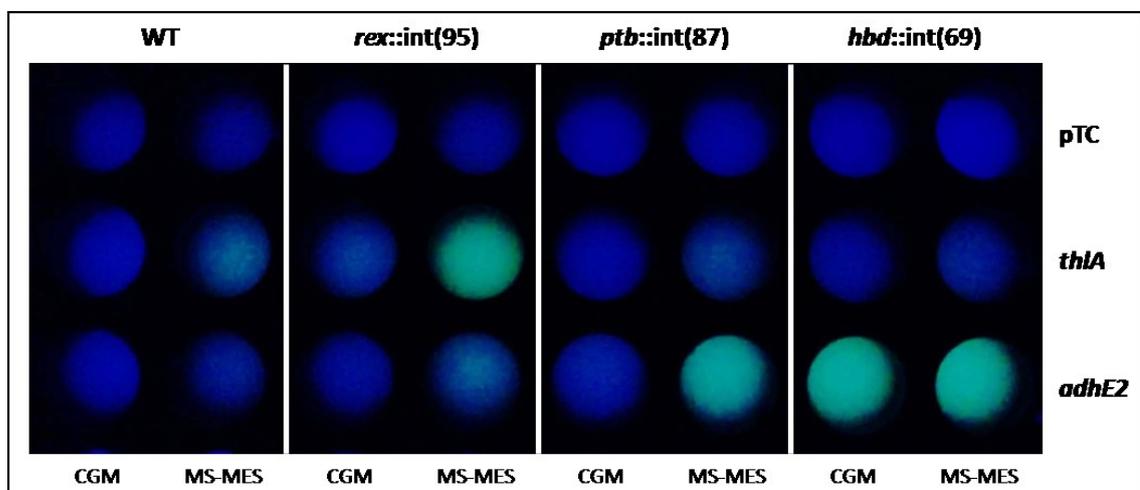


Abb. 3.21: *thIA*- und *adhE2*-Promotor-vermittelte Fluoreszenz verschiedener Pp2-exprimierender *C. acetobutylicum*-Stämme unter UV-Licht. In 10 ml Komplexmedium (CGM)- bzw. 10 ml Minimalmedium (MS-MES)-kultivierte, exponentiell wachsende Zellen wurden sedimentiert, 2x gewaschen und resuspendiert (PBS). Je 250 μ l der Suspension wurden in 96-Well Fluoreszenz-Mikrotiterplatten unter UV-Licht dokumentiert. *C. acetobutylicum* Wildtyp (WT). Kontrolle (pTC); *thIA*-Promotoraktivität (*thIA*); *adhE2*-Promotoraktivität (*adhE2*).

Deutlich erkennbar war die jeweils höhere Aktivität der Promotoren bzw. die Expression des Pp2-Reporterproteins in Minimalmedium (MS-MES)-kultivierten Zellen. Zudem konnte eine erhöhte Aktivität des *thIA*-Promotors von *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zum Wildtyp von *C. acetobutylicum* gezeigt werden, die im Gegensatz zu den vorherigen Messungen steht (Abb. 3.20). Ebenfalls ersichtlich war die leicht gesteigerte Aktivität des *adhE2*-Promotors in *C. acetobutylicum rex::int(95)*. Auffällig zeigte sich ferner die starke Expression des Pp2-Proteins unter Kontrolle des *adhE2*-Promotors in den Integrationsstämmen *C. acetobutylicum ptb::int(87)* und *C. acetobutylicum hbd::int(69)*, die ebenfalls im Kontrast zu den zuvor erfolgten

Einzelmessungen steht (Abb. 3.20). Die schwach visualisierte Aktivität des *thIA*-Promotors der beiden Stämme ähnelt, wie bereits in Abb. 3.20 dargestellt, der des *C. acetobutylicum* Wildtyps.

Außerdem konnte eine grundlegende Steigerung der Promotor-vermittelten Pp2-Fluoreszenz der pTC-Serie im Vergleich zu den entsprechenden *C. acetobutylicum*-Stämmen der pT-Serie ermittelt werden. Die *thIA*-Promotor-vermittelte Fluoreszenz des Stammes *C. acetobutylicum* pTC::P(*thIA*)pp2 (Abb. 3.20) erreichte ca. doppelt so hohe Werte im Vergleich zur *C. acetobutylicum* pT::P(*thIA*)pp2-Fluoreszenz (Tab. 3.2). Auch während der wachstumsphysiologischen Untersuchungen konnte diese Tendenz beobachtet werden (Abb. 3.15, Abb. A.14).

3.3.2.2. Wachstumsabhängige Aktivität des *adhE2*-Promotors im Wildtyp von *C. acetobutylicum* und verschiedenen Integrationsstämmen

Aufbauend auf den Ergebnissen der Promotoraktivitätsmessungen im kleinen Maßstab (10 ml-Kulturen; 3.3.2.1.) schlossen sich die Charakterisierungen der *adhE2*-Promotoraktivitäten der *C. acetobutylicum*-Stämme im größeren Maßstab (200 ml-Kulturen) an (Abb. 3.22).

Es fiel eine geringere *thIA*-Promotor-vermittelte Pp2-Expression aller Integrationsstämmen während der hier beschriebenen Kultivierung im Vergleich zu den vorherigen Messungen auf (Abb. 3.20, Abb. A.14). Im Gegensatz dazu konnte für den *adhE2*-Promotor, gemessen an den in Abb. 3.20 gezeigten Werten eine hohe Aktivität in den Integrationsstämmen, sowie eine geringe Aktivität für den *C. acetobutylicum* Wildtyp dargestellt werden (Abb. 3.22B). Für den *adhE2*-Promotor wurde, wie schon zuvor (Abb. 3.20) eine dereprimierte Aktivität in *C. acetobutylicum* *rex*::int(95) gegenüber dem *C. acetobutylicum* Wildtyp festgestellt (Abb. 3.22B). Die *adhE2*-Promotor-vermittelte Pp2-Expression im Wildtyp von *C. acetobutylicum* war wie auch in Abb. 3.21 gezeigt, im Vergleich zur Kontrolle (pTC-Plasmid) vernachlässigbar. Im Detail konnte für die *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen *rex*::int(95) und *hbd*::int(69) jeweils eine ca. 5-fach höhere *adhE2*-Promotoraktivität ermittelt werden. Ferner zeigte *C. acetobutylicum* *ptb*::int(87) eine ca. 3-fach gesteigerte Aktivität des *adhE2*-Promotors.

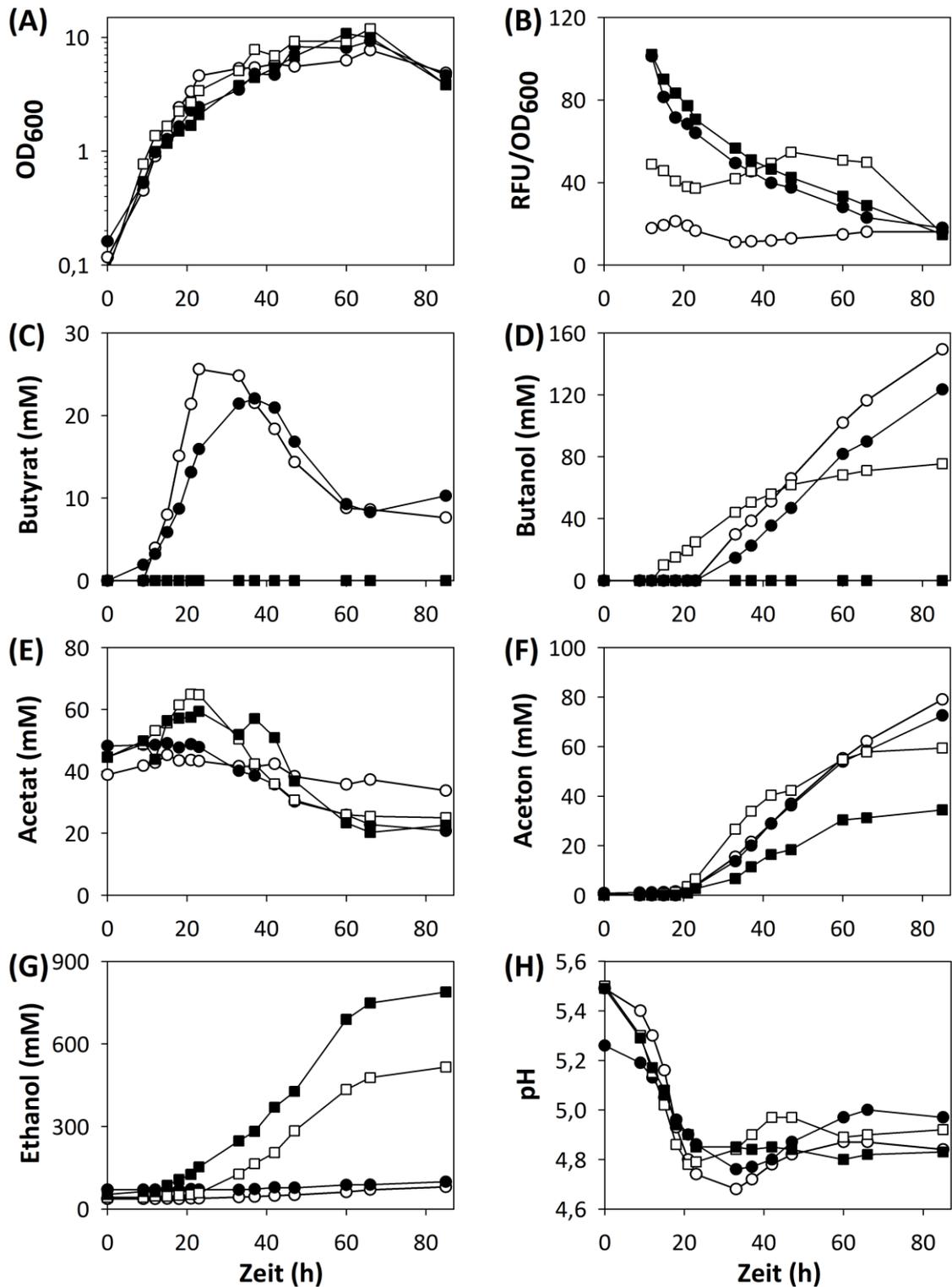


Abb. 3.22: *In vivo*-Analysen der *adhE2*-Promotoraktivitäten (B) und wachstumsphysiologische Charakterisierungen (A, C-H) verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 200 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 15 µg/ml Thiamphenicol angezogen. Das Wachstum wurde durch Messung der Optischen Dichte (OD₆₀₀) verfolgt. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Es sind repräsentative Daten von mindestens zwei Replikaten dargestellt. Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). ○ Wildtyp; ● *rex::int(95)*; □ *ptb::int(87)*; ■ *hbd::int(69)*. E_x=449 nm/E_m=495 nm.

Zudem fiel eine mit der exponentiellen Wachstumsphase assoziierte Promotoraktivität der *C. acetobutylicum*-Integrationsstämme *rex::int(95)* und *hbd::int(69)* auf. Im Gegensatz dazu wurde für *C. acetobutylicum ptb::int(87)* ein vergleichsweise konstantes *adhE2*-Promotoraktivitätsprofil dokumentiert.

Im Hinblick auf die Fermentationsprodukte der *C. acetobutylicum*-Integrationsstämme (Abb. 3.22C-G) zeigten sich speziell für *C. acetobutylicum rex::int(95)* einige Unterschiede zu dem durch Wietzke & Bahl (2012) veröffentlichten Phänotyp: so bildeten die hier untersuchten rekombinanten Stämme weit weniger Ethanol (ca. 95 mM statt 180 mM), dafür jedoch mehr Butyrat (ca. 20 mM statt 5 mM). Auch eine frühere Produktion von Butanol wurde nicht belegt. Für *C. acetobutylicum ptb::int(87)* konnten Lösungsmittelkonzentrationen ermittelt werden, die vergleichbar mit den von Lehmann *et al.* (2012b) veröffentlichten Werten sind. Auch die Produktion von Acetat war ähnlich. Die für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* ermittelten Konzentrationen der Fermentationsprodukte stimmten ebenfalls mit den durch Lehmann & Lütke-Eversloh (2011) publizierten Werten überein.

Im Verlauf der Arbeit fielen Unregelmäßigkeiten während der Promotoraktivitätsanalysen dieser rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme auf. So zeigten einige Stämme drastische Unterschiede der Promotor-vermittelten Fluoreszenz zu Beginn (direkt nach der Generierung der Stämme; Abb. 3.20) und zum Ende der Charakterisierung (nach Abschluss der Wachstumsversuche; Abb. 3.22B). Erstaunlicherweise konnte beispielsweise eine hohe *adhE2*-Promotoraktivität des *C. acetobutylicum* Wildtyps festgestellt werden (ca. 160-220 RFU/OD₆₀₀), welche darauffolgend bzw. während der wachstumsphysiologischen Untersuchungen nicht weiter nachweisbar war. Auch der Integrationsstamm *C. acetobutylicum rex::int(95)* wies zunächst eine hohe Aktivität des *adhE2*-Promotors auf (ca. 210-330 RFU/OD₆₀₀), die anschließend stark abnahm (ca. 70 RFU/OD₆₀₀), jedoch immer signifikant höher als die des *C. acetobutylicum* Wildtyps war (ca. 40 RFU/OD₆₀₀). Für *C. acetobutylicum ptb::int(87)* wurde die niedrigste Aktivität des *adhE2*-Promotors (ca. 60-100 RFU/OD₆₀₀) im Vergleich zu den Anfangs-Messwerten des *C. acetobutylicum* Wildtyps ermittelt. Lediglich in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* zeigte die durch den *adhE2*-Promotor vermittelte Pp2-Fluoreszenz ein konstant hohes Level.

3.4. Entwicklung eines induzierbaren Expressionssystems

Induzierbare Expressionssysteme finden v. a. Anwendung in der Produktion von medizinisch oder industriell bedeutenden Proteinen. Aber auch die gezielte Expression von Schlüsselenzymen während einer effizienten Stammoptimierung stellt einen entscheidenden Vorteil dieser Systeme dar. So ermöglichen entsprechende Vektoren eine regulierte Synthese der klonierten Gene sowie die Möglichkeit zur physiologischen Analyse, d. h. die unmittelbare Reaktion der Zellen auf die Induktion eines bestimmten Gens.

Bisher wurden vier induzierbare Systeme für die Anwendung in *C. acetobutylicum* beschrieben. Zum einen wurde ein System auf Grundlage des Xylose-Operons von *Staphylococcus xylosus* genutzt, das jedoch nur unzureichend funktionierte (Girbal *et al.*, 2003). So stellte sich die Verwendung von Xylose (Induktor) als alleinige Kohlenstoffquelle als ungeeignet heraus, da *C. acetobutylicum* meist in Glukose-haltigem Medium kultiviert wird. Zudem führte eine direkte Zugabe von Xylose aufgrund der Glukose-vermittelten Katabolitenrepression nicht zur Induktion. Zum anderen wurde festgestellt, dass der *C. acetobutylicum* *recA*-Promotor durch UV-Strahlung induzierbar ist (Nuyts *et al.*, 2001). Allerdings zeigte die Expression des *lacZ*-Reportergens unter Kontrolle des *recA*-Promotors nach 2 Gy-Bestrahlung lediglich eine 20-30 %ige Steigerung.

Außerdem wurde vor kurzem ein Anhydrotetracyclin-induzierbares System etabliert (Dong *et al.*, 2012), welches zu Beginn dieser Arbeit jedoch noch nicht zur Verfügung stand. Daher wurde der durch Heap *et al.* (2007) beschriebene artifizielle IPTG (Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid)-induzierbare *fac*-Promotor als Grundlage für die Entwicklung eines induzierbaren Expressionssystems verwendet. Dieser stellt eine Fusion des *lacO*-Operators aus *E. coli* mit dem *fdx*-Promotor aus *C. pasteurianum* dar. Obwohl unter Verwendung des Chloramphenicol-Acetyltransferasegens (*catP*) als Reporter eine signifikante Grundexpression in Abwesenheit des Induktors IPTG und eine nur max. 10-fache Steigerung der Expression ermittelt wurden (Dong *et al.*, 2012), konnte dieses induzierbare System als Basis für ein weiteres Anwendungsbeispiel des FbFP-basierten Reportersystems in *C. acetobutylicum* dienen.

3.4.1. Klonierung des *fac*-Promotors und des *lacI*-Repressors

Analog zu der unter 3.2.1. beschriebenen Vorhergehensweise wurde der Thiolasegen (*thlA*)-Promotor in pT::P(*thlA*)*pp2* (Schulz, 2009) durch den induzierbaren *fac*-Promotor (Heap *et al.*, 2007) ersetzt. Für die Induzierbarkeit des Expressionssystems schloss sich die Klonierung des *lacI*-Gens in das Plasmid pT::P(*fac*)*pp2* an. Dieses kodiert für einen Repressor, der an den *fac*-Promotor bindet. Unter Zugabe von IPTG wird das LacI-Protein gehemmt sodass der *fac*-Promotor aktiviert wird.

3.4.1.1. Konstruktion des pTi-Plasmids als induzierbares System

Zunächst wurde, wie unter 3.2.1.1. beschrieben, der *fac*-Promotor (171 Bp) anstelle des *thlA*-Promotors in den pT-Shuttle-Vektor kloniert. Für die Amplifikation des *fac*-Promotors diente das Plasmid pMTL007 als Template (Heap *et al.*, 2007). In Abb. 3.23A ist exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung der *fac*-Promotor-Fragmente aus verschiedenen PCR-Ansätzen (2.8.7.2.) dargestellt.

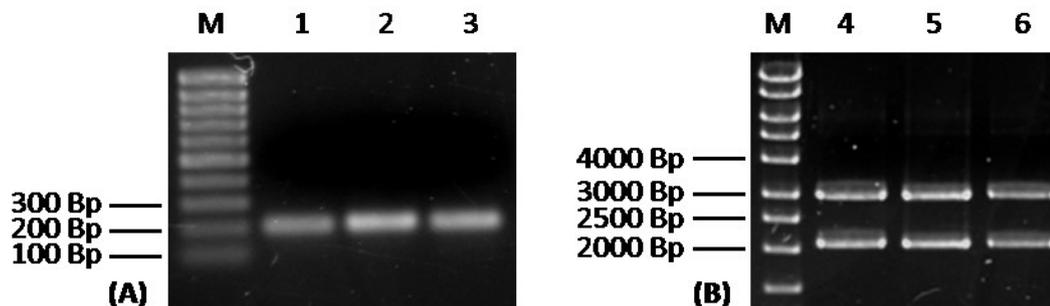


Abb. 3.23: Amplifikation des *fac*-Promotors (A) und Kontrollrestriktion von pT::P(*fac*)*pp2* (B). Dargestellt sind 1%ige [w/v] Agarosegele nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden je 1 μ l. **M** MassRuler™ DNA Ladder Mix; **1-3** PCR-Amplifikate des *fac*-Promotors (171 Bp); **4-6** Hydrolyse von pT::P(*fac*)*pp2* mit *NdeI* (3038 Bp und 2127 Bp).

Die Ligation (2.8.4.3.) des Promotor-Fragments in den vorbereiteten Vektor (4992 Bp) erfolgte aufgrund der geringen Fragmentgröße im Verhältnis 1:10 und 1:20. Im Anschluss an die Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (2.9.3.) und die Selektion potentiell positiver Klone mittels Ampicillin-Resistenz auf Festmedien wurden Kontrollrestriktionen der isolierten Plasmide unter Verwendung des Restriktionsenzym *NdeI* durchgeführt. Der Nachweis für einen erfolgreichen Austausch des Promotors basierte auf der Tatsache, dass das Enzym im *fac*-Promotor, aber nicht im

thlA-Promotor zu einer Hydrolyse führte. Positive pT::P(*fac*)*pp2*-Plasmide zeigten nach der Restriktion zwei Fragmente (3038 Bp und 2127 Bp), der Ausgangsvektor pT::P(*thlA*)*pp2* hingegen ein Fragment (5457 Bp). Abb. 3.23B zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Kontrollhydrolyse. Zur Verifizierung des rekombinanten pT::P(*fac*)*pp2*-Plasmids erfolgte die Sequenzierung (LGC Genomics GmbH, Berlin).

Anschließend wurde das *lacI*-Repressorgen (unter Kontrolle des clostridiellen *ptb*-Promotors; 1694 Bp) in den pT::P(*fac*)*pp2*-Vektor integriert (pTi-Plasmid). Die Amplifikation des Gens erfolgte vom pMTL007-Plasmid (Heap *et al.*, 2007), wobei die verwendeten Primer *Clal*-Restriktionsschnittstellen (Tab. 2.4) enthielten. Die Hydrolyse des Vektors (5165 Bp) wurde ebenfalls mit dem *Clal*-Enzym durchgeführt. Die detaillierte Vorgehensweise ist zu der unter 3.1.1.1. beschriebenen analog. Die Ligation erfolgte im Verhältnis 1:5 und 1:10.

Abb. 3.24 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung des hydrolysierten, geleluierten *lacI*-Fragments (A) und der Fragmente der Kontrollrestriktion potentiell positiver pTi-Plasmide mittels *Clal* (B). Die Vektorkarten der erzeugten Plasmide sind im Anhang dargestellt (Abb. A.4).

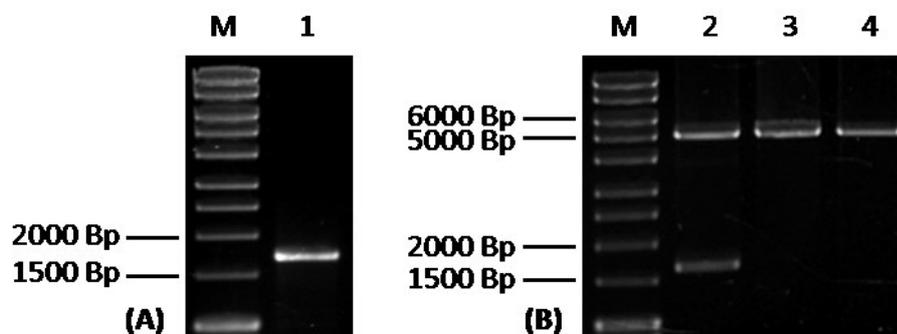


Abb. 3.24: Geleluat des *lacI*-Gens (A) und Kontrollrestriktion potentiell positiver pTi-Plasmide (B). Dargestellt sind 1 %ige [w/v] Agarosegele nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden je 1 μ l. M MassRuler™ DNA Ladder Mix; 1 Geleluat des *lacI*-Gens (1694 Bp); Hydrolyse mit *Clal*: 2 pTi (5165 Bp und 1694 Bp), 3-4 pT::P(*fac*)*pp2* (5165 Bp).

3.4.1.2. Funktionsnachweis des induzierbaren Systems in *E. coli*

Die Fluoreszenzanalysen der neu erstellten rekombinanten *E. coli* DH5 α -Stämme zeigten ausnahmslos eine Pp2-vermittelte Fluoreszenz unter Kontrolle des *fac*-Promotors (Abb. 3.25). Trotz der LacI-Repression des Promotors im pTi-Plasmid wurde eine signifikant zur pT-Kontrolle (Plasmid ohne Reporter gen) gesteigerte Grund-

fluoreszenz in Abwesenheit des Induktors registriert (ca. 80 RFU/OD₆₀₀, E_m=495 nm). Durch Zugabe von 1 mM IPTG (Heap *et al.*, 2007) zu der *E. coli* pTi-Kultur konnte eine schwache Induktion der Pp2-Expression dargestellt werden (ca. 105 RFU/OD₆₀₀, E_m=495 nm), die allerdings deutlich unter den Fluoreszenzwerten von *E. coli* pT::P(*fac*)pp2 (ca. 240 RFU/OD₆₀₀, E_m=495 nm) lag.

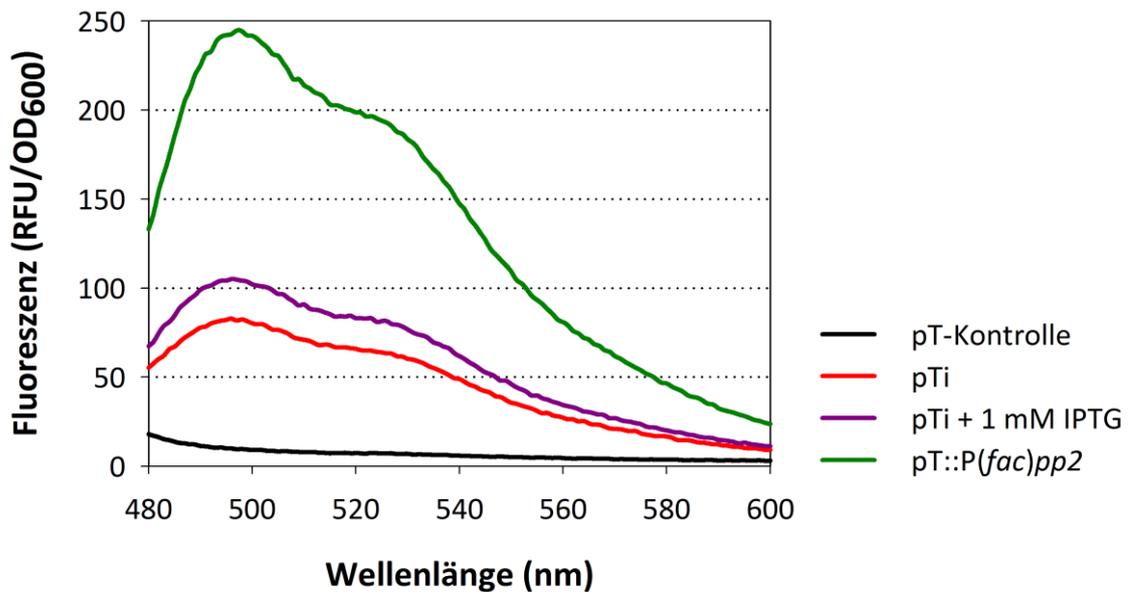


Abb. 3.25: Emissionsspektren und Induktionsnachweis des pTi-Systems rekombinanter *E. coli*-Stämme. Die rekombinanten Stämme wurden aerob ü. N. bei 37 °C in 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm.

Im Vergleich zum *thIA*-Promotor (Abb. 3.13) vermittelte der *fac*-Promotor des Plasmids pT::P(*fac*)pp2 eine leicht erhöhte Expression des Pp2-Fluoreszenzproteins in den rekombinanten *E. coli*-Zellen.

3.4.2. Charakterisierung des induzierbaren Systems in *C. acetobutylicum*

Um eine grundlegende Charakterisierung des hier entwickelten induzierbaren Systems in *C. acetobutylicum* durchzuführen, wurden das pTi- und auch das pT::P(*fac*)pp2-Plasmid methyliert und anschließend in *C. acetobutylicum* elektrotransformiert (2.9.5.). Die Selektion der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme erfolgte durch die Plasmid-vermittelte Erythromycin-Resistenz.

3.4.2.1. Funktionsnachweis des induzierbaren Systems in *C. acetobutylicum*

Während der Charakterisierung von *C. acetobutylicum* pTi fiel zunächst auf, dass sowohl in Komplexmedium (CGM) als auch in Minimalmedium (MS-MES) angezogene Zellen eine nur gering höhere Fluoreszenz (23 bzw. 21 RFU/OD₆₀₀) als *C. acetobutylicum* pT aufwiesen (Tab. 3.2). Der Stamm wurde im Anschluss auf Induzierbarkeit nach Angaben von Heap *et al.* (2007) untersucht. Es erfolgte die Zugabe von 1 mM IPTG zu den exponentiell wachsenden Zellen (10 ml MS-MES), sowie die Aufnahme von Fluoreszenzspektren nach dreistündiger Inkubation (Abb. 3.26). Eine Induktion unter den beschriebenen Bedingungen konnte dargestellt werden. Es wurde eine 4,5-fache Steigerung der Fluoreszenzwerte (ca. 96 RFU/OD₆₀₀) ermittelt.

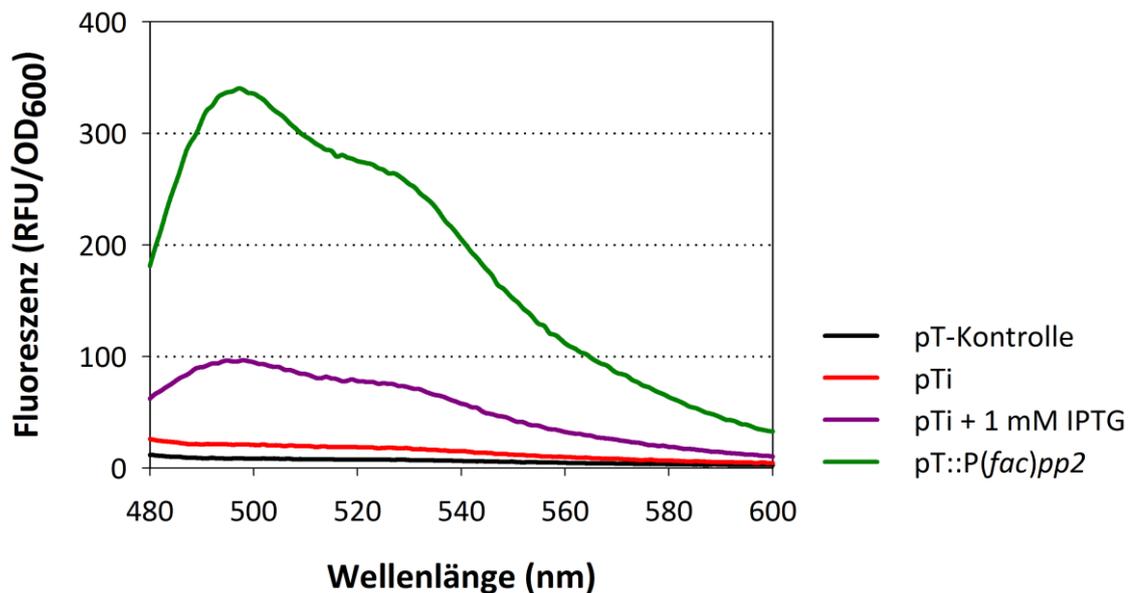


Abb. 3.26: Emissionsspektren und Induktionsnachweis des pTi-Systems rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 10 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 20 µg/ml Erythromycin angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm.

Des Weiteren konnte die in dieser Arbeit höchste Pp2-basierte Fluoreszenz in *C. acetobutylicum* durch Expressionskontrolle des artifiziellen *fac*-Promotors in Abwesenheit des *lacI*-Repressorgens dargestellt werden (ca. 337 RFU/OD₆₀₀, E_m=495 nm). Im Vergleich zur Aktivität des *ptb*-Promotors (Abb. 3.14) war die Pp2-Expression hier etwa doppelt so hoch. Gegenüber der *thIA*-Promotoraktivität (Abb. 3.14) wurde eine ca. 6-fach höhere Pp2-Expression der rekombinanten *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)pp2-

Zellen festgestellt. Wachstumsphysiologische Untersuchungen von *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)pp2 zeigten ein Aktivitätsmaximum des Promotors in der exponentiellen Phase (ca. 300 RFU/OD₆₀₀) und eine allmähliche Abnahme der Aktivität während des stationären Wachstums (Abb. A.15).

3.4.2.2. IPTG-vermittelte Induktion in *C. acetobutylicum*

Um die IPTG-vermittelte Induktion von *C. acetobutylicum* pTi näher zu charakterisieren, wurden Analysen hinsichtlich der Inkubationszeit und der Konzentration des eingesetzten Induktors durchgeführt.

Zunächst erfolgten die Probenahmen und Fluoreszenzbestimmungen in unterschiedlichen Zeitintervallen, wobei den exponentiell wachsenden Kulturen (10 ml MS-MES) 1 mM IPTG zugesetzt wurde (Abb. 3.27). Bereits nach 60 min konnte eine signifikante Steigerung der Fluoreszenz um ca. 44 % gezeigt werden. Nach weiteren 60 bzw. 120 min steigerte sich die Expression des Fluoreszenzproteins um 163 % bzw. 207 %.

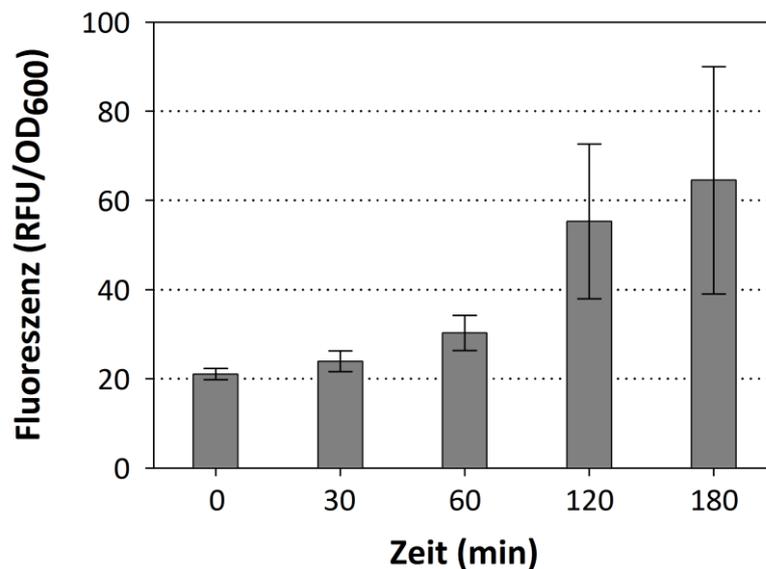


Abb. 3.27: Induktion von *C. acetobutylicum* pTi mit 1 mM IPTG. Die Fluoreszenz exponentiell wachsender Zellen (10 ml MS-MES, 20 µg/ml Erythromycin; OD₆₀₀ 0,8) wurde nach Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm. n=3.

Anschließend wurde die Konzentration des Induktors variiert, wobei den exponentiell wachsenden *C. acetobutylicum* pTi-Zellen (10 ml MS-MES) 0,2-2,0 mM IPTG zugesetzt und nach dreistündiger Kultivierung die Charakterisierung hinsichtlich der Pp2-basier-

ten Fluoreszenz erfolgte. Im Vergleich zur Induktion durch 1 mM IPTG zeigten die Kulturen eine um ca. 2-15 % verringerte Expression (Abb. A.16).

3.5. Entwicklung eines Fluoreszenz-Hochdurchsatz-Screenings für *C. acetobutylicum*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden detaillierte Untersuchungen zur genetischen und physiologischen Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften Pp2-exprimierender *C. acetobutylicum*-Stämme durchgeführt (3.1.). So konnten z. B. Kolonien auf Agarplatten nach Blaulichtbestrahlung und einzelne Zellen in Fluoreszenzmikroskopischen Analysen von Zellen des Kontrollstamms differenziert werden. Ebenso war es möglich, die Aktivität mehrerer nativer Promotoren (*thIA*, *ptb*, *adc*, *hydA*, *adhE2*) mit Hilfe des neu etablierten Systems während des Wachstums rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme zu charakterisieren (3.2. und 3.3.). Diese Aspekte sind für potentielle Anwendungen des FbFP-basierten Reportersystems, wie z. B. der Analyse von Populationen im Hochdurchsatz (*high-throughput screening*, HTS) essentiell. Erste Untersuchungen belegten eine einfache und schnelle Differenzierung der vorhandenen Varianten.

3.5.1. Anzucht von *C. acetobutylicum* in Mikroturen

Grundlegend für ein HTS ist die Möglichkeit, zeitgleich eine größere Anzahl an verschiedenen Individuen einer bestimmten Population nach festgelegten Merkmalen zu durchmustern. Erst kürzlich wurde die Kultivierung von *C. acetobutylicum* in Mikroturen etabliert, die auf einer Anzucht in 96-Well Platten mit einem Volumen von je 1 ml basiert (Scheel, 2012). Hierfür erfolgte die Inokulation von *C. acetobutylicum*-Einzelkolonien in je 1 ml Komplexmedium (CGM). Nach 24 h anaeroben Wachstums bei 37 °C wurde je 1 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 10 µl der CGM-Mikroturen inokuliert. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation konnten die *C. acetobutylicum*-Zellen für das Screening mittels Fluoreszenzmessungen verwendet werden (3.5.2., 3.5.3.).

3.5.2. Fluoreszenzmessungen in Mikrotiterplatten

Für Fluoreszenzmessungen von *C. acetobutylicum*-Zellsuspensionen in Mikrotiterplatten war es notwendig, die bereits etablierten Messungen in Küvetten (Schulz, 2009) anzupassen. Anhand des vorhandenen Pp2-exprimierenden *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*pp2*-Stammes (3.2.) wurde ein Protokoll zur Messung und Differenzierung fluoreszierender Varianten im Hochdurchsatz erstellt. Hierzu erfolgte zunächst die Untersuchung diverser Messparameter am SpectraMaxM2^e Mikrotiterplattenreader (Molecular Devices, Ismaning).

Die Einstellungen des SpectraMaxM2^e hinsichtlich einer optimierten FbFP-Fluoreszenzbestimmung in Mikrotiterplatten wurden maßgeblich nach den Herstellerangaben durchgeführt (Molecular Devices, Ismaning). Es konnte der für Zellsuspensionen empfohlene Bottom-Read, eine 15 s Durchmischung der Platten vor der Messung und die Auto-PMT (*photomultiplier tube*) übernommen werden. Zudem erfolgte die Einstellung von 6 Readings/ Well. Im Verlauf dieser Arbeiten zeigte sich außerdem, dass Variationen des Probenvolumens (100 μ l bzw. 200 μ l) keinen Effekt auf die Messwerte ausübten. Die Parameter-variierten Analysen wurden zu Beginn mit *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*pp2*-Zellen durchgeführt, welche in 10 ml MS-MES angezogen wurden. Es erfolgten vergleichende Fluoreszenzmessungen in Küvetten und Mikrotiterplatten, wobei die Optische Dichte (OD₆₀₀) der Zellsuspensionen zuvor manuell auf Werte von 0,2 bis 0,9 eingestellt wurde. Dabei fielen starke Abweichungen zwischen der in Mikrotiterplatten und der in Küvetten ermittelten Optischen Dichte auf. Die in den Mikrotiterplatten gemessenen Absorptionswerte waren wesentlich niedriger, weshalb die analysierten *C. acetobutylicum*-Stämme durchgehend eine höhere Fluoreszenz aufwiesen. Dennoch konnte eine signifikante Differenzierung der Fluoreszenz von *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*pp2* gegenüber *C. acetobutylicum* pT erzielt werden (vgl. Abb. 3.28). Außerdem wurden gleichbleibende Fluoreszenzwerte bei einer zuvor ermittelten Optischen Dichte von 0,7-0,9 festgestellt. Während der Anzucht in 96-Well Platten erreichten die *C. acetobutylicum*-Stämme aufgrund des geringen Kulturvolumens eine geringere Optische Dichte als z. B. in 10 ml-Kulturen. Zudem war während der Durchführung des Fluoreszenz-HTS aus praktischen Gründen die manuelle Einstellung der Optischen Dichte der Proben in Küvetten (2.11.) unvorteilhaft bzw. zeitintensiv (96 Proben/ Platte). Daher wurde während der weiteren

Etablierung auf dieses Vorgehen verzichtet und die jeweilige Optische Dichte der in den 96-Well Platten kultivierten *C. acetobutylicum*-Stämme für die Normalisierungen der Messwerte genutzt.

Um eine Überlagerung der emittierten Fluoreszenz ($E_m=495$ nm) durch die Anregungswellenlänge ($E_x=449$ nm) zu unterbinden, sollte bei der Wahl der Filtereinstellungen beachtet werden, dass diese mindestens 100 nm voneinander entfernt liegen oder ein entsprechender Cutoff (Filter) eingeführt wird. Eine Änderung der maximalen Anregung auf 439 nm zeigte keinen positiven Effekt. Im Vergleich wiesen die *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*pp2*-Zellen unter Verwendung des (voreingestellten) 495 nm-Cutoffs zwar nur ca. 50 % der Fluoreszenz gegenüber den Messungen ohne Cutoff, jedoch eine ca. 10-fach gesteigerte Differenzierung zum Kontrollstamm *C. acetobutylicum* pT auf.

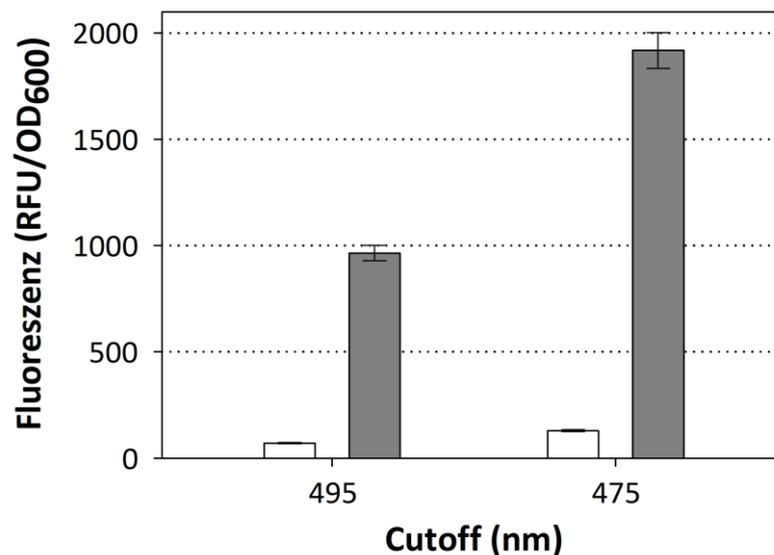


Abb. 3.28: Fluoreszenzmessungen rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme in Mikrotiterplatten unter Verwendung verschiedener Cutoff-Parameter. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 10 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 20 µg/ml Erythromycin angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). pT-Kontrolle (weiß), pT::P(*ptb*)*pp2* (grau). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). $E_x=449$ nm/ $E_m=495$ nm; Bottom-Read; 15 s Mix; PMT Auto; 6 Reads/Well; Cutoff 495 nm bzw. 475 nm. n=8.

Ferner sollten das E_m -Maximum (495 nm) und der Cutoff-Filter (495 nm) laut Molecular Devices (Ismaning) mindesten 10 nm voneinander entfernt liegen. Daher wurde die Einstellung eines 475 nm-Cutoffs getestet. Der Cutoff verhinderte in diesem Fall die maximale Anregung ($E_x=449$ nm), hemmte diese allerdings weniger als bei

495 nm. In Abb. 3.28 ist eine ca. 110 %ig gesteigerte Differenzierung mittels 475 nm-Cutoff gegenüber dem voreingestellten 495 nm-Cutoff ersichtlich.

Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll für die Differenzierung fluoreszierender *C. acetobutylicum*-Stämme im Hochdurchsatz beinhaltet zunächst die Sedimentation (4000 rpm, 4 °C, 12 min) der Mikrokulturen (3.5.1.) in den 96-Well Platten. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml PBS-Puffer erfolgte die Resuspension der Zellpellets (1 ml PBS-Puffer), wovon je 200 µl der Suspensionen für die Fluoreszenzmessungen eingesetzt wurden. Es erfolgte die Bestimmung der Optische Dichte (OD_{600}) der Proben in klaren 96-Well Mikrotiterplatten für eine anschließende Normalisierung der Messwerte. Die Fluoreszenzbestimmungen wurden in speziellen Mikrotiterplatten durchgeführt (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen). Die ermittelten Parameter für eine optimierte Fluoreszenzmessung im Hochdurchsatz sind abschließend in Tab. 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.3: SpectraMaxM2^e-Parameter für Fluoreszenzmessungen im Hochdurchsatz.

Parameter	Funktion	Einstellung
Read	Messung	Bottom
Mix	Durchmischen	15 s
PMT	<i>photomultiplier tube</i>	Auto
Reads/ well	Messungen/ Well	6
E _x	Anregungswellenlänge	449 nm
E _m	Emissionswellenlänge	495 nm
Cutoff	Filter	475 nm

3.5.3. Differenzierung rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme mittels Fluoreszenz-HTS

Abschließend sollte die Anwendung des neu entwickelten HTS zur Differenzierung fluoreszierender Stämme anhand vorhandener Pp2-exprimierenden *C. acetobutylicum*-Stämme (*thIA*-, *ptb*-, *adc*-, *hydA*- und *fac*-Promotor; 3.2. und 3.4.) überprüft werden. Hierfür wurden die rekombinanten Zellen in 96-Well Platten kultiviert (3.5.1.) und die Promotor-vermittelte Fluoreszenz der *C. acetobutylicum*-Varianten im Hochdurchsatz bestimmt (3.5.2.).

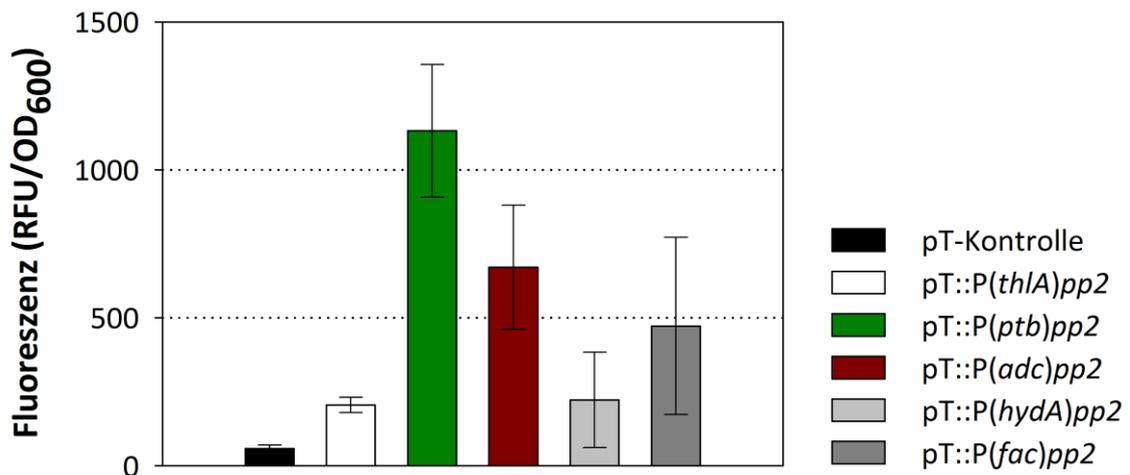


Abb. 3.29: Vergleich der Promotoraktivitäten rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme mittels Fluoreszenz-HTS. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 1 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 20 µg/ml Erythromycin angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm; Bottom-Read; 15 s Mix; PMT Auto; 6 Reads/Well; Cutoff 475 nm. n≥16.

Die in Abb. 3.29 dargestellten Promotoraktivitäten der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme zeigten einerseits eine klare Differenzierung zum Kontrollstamm *C. acetobutylicum* pT, andererseits spiegelten sich die zuvor bestimmten Promotor-spezifischen Fluoreszenzwerte wider. Obwohl die Tendenzen der verschiedenen Promotoraktivitäten der einzelnen *C. acetobutylicum*-Stämme bestätigt wurden, zeigten die Fluoreszenzmessungen im Mikrotiterplatten-Format starke Schwankungen. Ebenfalls fiel auf, dass die ermittelten Messwerte insgesamt höher lagen als die durch Küvettenmessungen gewonnenen (Abb. 3.14 und Abb. 3.26). Wie unter 3.5.2. verdeutlicht, bewirkte die in den Mikrotiterplatten ungenau ermittelte Optische Dichte (OD₆₀₀) diesen Effekt. Insgesamt zeigten die Stamm-spezifischen Promotoraktivitäten, dass das hier entwickelte Protokoll des Fluoreszenz-HTS weiteres Anwendungspotential bietet.

4. Diskussion

Clostridium acetobutylicum zeichnet sich durch seinen charakteristischen Fermentationsmetabolismus aus, in dem zunächst die Säuren Acetat und Butyrat und mit Beginn der stationären Phase die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol gebildet werden. Derzeit wird dieses Bakterium in diversen Studien untersucht (Alsaker *et al.*, 2010; Ezeji *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 2010; 2012; Lütke-Eversloh & Bahl, 2011; Grimmler *et al.*, 2011; Hönicke *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2012) und stellt den Modellorganismus für die apathogenen Clostridien dar. Im Vergleich zu anderen Modellorganismen ist gegenwärtig nur eine geringe Anzahl an molekularbiologischen Methoden für die Untersuchungen des strikt anaeroben *C. acetobutylicum* vorhanden. Sicherlich auch durch diesen Mangel bedingt, konnten bis heute essentielle Mechanismen, wie z. B. das Umschalten des Metabolismus und die Zelldifferenzierung für das Verständnis dieses Organismus nicht abschließend aufgeklärt werden.

Entsprechende Reportersysteme können hierbei die Analyse der Genexpression vereinfachen. Bisher wurden vier *ex vivo* Systeme, basierend auf einem Luziferase-Assay oder Messungen von Enzymen in Zellrohextrakten für *C. acetobutylicum* beschrieben (Tummala *et al.*, 1999; Girbal *et al.*, 2003, Scotcher *et al.*, 2003; Feustel *et al.*, 2004). Nachteil dieser Methoden ist jedoch das einhergehende Absterben der Clostridien, da diese entweder Sauerstoff ausgesetzt sind oder für die enzymatischen Messungen lysiert werden müssen. Während dieser Arbeit wurde daher ein Reportersystem etabliert, welches keinen Sauerstoff benötigt und die Zellen nicht zerstört. Zudem konnte die Anwendbarkeit dieses ersten Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems für den Anaerobier *C. acetobutylicum* in mehreren Beispielen dargestellt werden.

4.1. Etablierung eines FbFP-basierten Reportersystems

Ausgehend von zuvor generierten Shuttle-Vektoren für *Escherichia coli* und *C. acetobutylicum*, die Flavinmononukleotid (FMN)-basierte Fluoreszenzproteine (FbFPs) kodieren und erstmals eine nachweisbare Fluoreszenz der rekombinanten Stämme vermittelten (Schulz, 2009), erfolgten detaillierte Charakterisierungen und Untersuchungen hinsichtlich möglicher Optimierungen des *in vivo* Reportersystems.

Für diesen Zweck wurden zunächst zusätzlich zu den FbFP-Reporter genen *bs1*, *bs3* und *pp2* (Schulz, 2009) ergänzend die Gene *bs2* und *pp1* in das bestehende Vektor-System kloniert (Übersicht: Tab. 3.1). Hintergrund war die Möglichkeit der vergleichenden Analyse aller zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Reporterproteine bezüglich ihrer Fluoreszenz-Eigenschaften in rekombinanten *E. coli*- bzw. *C. acetobutylicum*-Stämmen. Erstaunlicherweise vermittelten die Proteine Bs1 und Bs3 in *E. coli* signifikant höhere Fluoreszenz-Werte als Bs2. Die Expression dieses Proteins wurde in einer früheren Arbeit für *E. coli* optimiert und führte zu den höchsten Messwerten (Drepper *et al.*, 2007a). Da in der vorangegangenen Studie jedoch ein anderer *E. coli*-Expressionsstamm (BL21 (DE3)), sowie ein anderes Vektor-System (T7-Promotor) verwendet wurden, kann der Einfluss der hier variierten Parameter nicht ausgeschlossen werden. Beide für die Expression in *C. acetobutylicum* optimierten FbFP-Varianten (Bs3 und Pp2) vermittelten auch in *E. coli* eine signifikante Fluoreszenz. Diese war ebenfalls bei entsprechenden Kolonien unter UV-Licht und zuvor gewaschenen Zellpellets ersichtlich (Abb. 3.3). Bereits unter Normallicht zeigten die ungewaschenen Zellpellets des *bs3*- und *pp2*-exprimierenden *E. coli*-Stammes eine deutliche Grün-Färbung, die für eine gute Expression der Fluoreszenzproteine sprach.

Untersuchungen zur Proteinsynthese der entsprechenden rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme belegten eine deutliche Expression des Pp2-Fluoreszenzproteins (Abb. 3.4) und eine schwache Expression von Bs3 (Abb. A.11). Demnach erfolgte die effektivste Translation für die *C. acetobutylicum* Codon-optimierten FbFP-Varianten. Auch die Anfertigung von Emissionsspektren der fluoreszierenden *C. acetobutylicum*-Varianten zeigte die höchste Fluoreszenz für den Bs3- bzw. den Pp2-exprimierenden Stamm (Abb. 3.5). Generell wurden für die FbFP-exprimierenden *C. acetobutylicum*-Stämme jedoch geringere Fluoreszenz-Werte als für die rekombinanten *E. coli*-Stämme ermittelt (Abb. 3.2 und Abb. 3.5). Mitunter kann dafür die Kopienzahl der Plasmide in den Zellen verantwortlich sein, wobei der in *E. coli* genutzte Replikationsursprung (ColE1, *ori*) eine hohe Plasmidanzahl bewirkt und der *C. acetobutylicum*-Replikationsursprung (pIM13, *repL*) eine wesentlich niedrigere (Riebe, 2009). Dagegen spricht, dass das Reporterprotein Pp2 in *E. coli* und in *C. acetobutylicum* annähernd die gleichen Fluoreszenz-Werte vermittelte. Demnach wurde von einer effektiveren Translation der FbFPs in *E. coli* im Vergleich zu

C. acetobutylicum ausgegangen. Die phänotypischen Untersuchungen der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme zeigten zunächst keine eindeutige Fluoreszenz der Kolonien unter UV-Licht. Jedoch konnten unter Verwendung von spezifisch definiertem Blaulicht ($E_x=365$ nm) signifikante Fluoreszenz-Unterschiede der rekombinanten Stämme auf Festmedien visualisiert werden (Abb. 3.6A-D). Zudem zeigten die gewaschenen Zellpellets v. a. des *pp2*-exprimierenden *C. acetobutylicum*-Stammes unter UV-Licht eine deutliche Fluoreszenz (Abb. 3.6G). Für das Protein Pp1 wurde verglichen mit Bs1 und Bs2 die höchste Photostabilität beschrieben (Produktinformation evoglow®: evocatal GmbH, Düsseldorf). Möglicherweise beruht die gute Visualisierung der Fluoreszenz des Pp1-Derivats Pp2 auf dieser Eigenschaft. Die erstmalige Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des *pp2*-exprimierenden *C. acetobutylicum*-Stammes belegte eine klare Expression des Fluoreszenzproteins im Vergleich zur Kontrolle *C. acetobutylicum* pT (Plasmid ohne Reportergen; Abb. 3.6H-I). Die erkennbare Hintergrundfluoreszenz des Kontroll-Stammes beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der von *C. acetobutylicum* gebildeten Granulose (persönliche Mitteilung: B. Tracy, Elcriton Inc., New Castle, USA).

4.1.1. Fluoreszenz-Optimierungen

Im Anschluss an die Charakterisierung der mittels verschiedener FbFP-Varianten generierten Fluoreszenz in rekombinanten *E. coli*- und *C. acetobutylicum*-Stämmen erfolgten Untersuchungen zu möglichen Optimierungen. Hierfür wurden als Schwerpunkte die wachstumsphysiologischen Parameter und molekulare Eigenschaften des Pp2-Reporterproteins analysiert.

Wie schon in einer vorangegangenen Arbeit dargestellt (Schulz, 2009) konnte eine höhere Fluoreszenz von in Minimalmedium (MS-MES) kultivierten *C. acetobutylicum*-Zellen im Vergleich zu Komplexmedium (CGM)-Kulturen ermittelt werden (Abb. 3.7). Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei Genexpressionsstudien mariner Bakterien unter Verwendung des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) beschrieben (Stretton *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass die Expression des jeweiligen Fluoreszenz-Proteins während eines langsameren Wachstums effektiver ist. Weiterhin wurde durch externe Zugabe von Riboflavin (Vitamin B₂), dem Vorstufensubstrat für die Synthese des Chromophors (FMN) versucht, die Fluoreszenz zu steigern. Bezüglich der Handhabung

stellte sich dieser Ansatz jedoch als ungeeignet dar, da das Vitamin eine geringe Löslichkeit in Wasser besitzt und nicht restlos aus dem Überstand der Zellen entfernt werden konnte (3.1.3.1.). Die für die Fluoreszenzmessungen eingeführten Waschschriffe mit PBS-Puffer erlaubten eine sensitivere Bewertung der FbFP-vermittelten Fluoreszenz (Schulz, 2009), da so die Eigenfluoreszenz des jeweiligen Kultivierungsmediums unterbunden wurde. Im Hinblick auf die angestrebten Promotorstudien war der Zusatz von Riboflavin ebenfalls nicht vorteilhaft, da dieser nicht den Standard-Kultivierungsbedingungen entsprach und somit ein möglicher Einfluss auf die Genexpression nicht ausgeschlossen werden konnte. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass Riboflavin eigenständig von *C. acetobutylicum* gebildet wird (Cai & Bennett, 2011). Interessanterweise konnten die Autoren nachweisen, dass in CGM-Medium kultivierte *C. acetobutylicum*-Zellen kaum messbare Mengen Vitamin B₂ bildeten, in MES-gepufferten Medien hingegen eine gute Bildung des Vitamins stattfand. Bezogen auf diese Studie kann in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen geschlossen werden, dass *C. acetobutylicum* entsprechend in MES-gepufferten Medien eine effektivere FbFP-vermittelte Fluoreszenz aufweist.

Untersuchungen zur Stabilität der FbFP-vermittelten Fluoreszenz rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme zeigten keine Abnahme der Fluoreszenz bei Raumtemperatur über 24 Stunden. Im Hinblick auf mögliche zukünftige Anwendungen der Reporterproteine wurde zudem die Stabilität bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen ermittelt. Obwohl eine stabile Fluoreszenz nur bis zu einer Temperatur von 45 °C gezeigt werden konnte (Abb. 3.8), sollte die Anwendbarkeit in z. B. thermophilen Bakterien nicht ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass diese Organismen spezifische Reperaturmechanismen besitzen, welche die Proteine z. B. vor hohen Temperaturen schützen (Morita *et al.*, 2010).

Neben einer wachstumsphysiologischen Optimierung der FbFP-vermittelten Fluoreszenz wurde im Speziellen die Steigerung der selbigen durch den Austausch der funktionellen Aminosäure Tyrosin (Tyr¹¹²) des Pp2-Proteins gegen die unpolare Aminosäure Alanin angestrebt. Hintergrund dieses Optimierungsversuchs auf molekularer Ebene waren Mutationsanalysen von FbFPs für *E. coli*, wobei der Austausch einiger Aminosäurereste des Pp1-Proteins zu einer höheren Fluoreszenz führte (Jentsch

et al., 2009). Das resultierende Pp2-Derivat (Pp3) vermittelte jedoch weder in *E. coli*, noch in *C. acetobutylicum* eine gesteigerte Fluoreszenz (Tab. 3.2).

4.1.2. Gegenüberstellung geeigneter Plasmidserien

Im Zuge der Etablierung des Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems für *C. acetobutylicum* ergab sich die Möglichkeit neben dem bisher verwendeten pT-Plasmid weitere Shuttle-Vektoren zu nutzen. Der vom pThydA_{Ca}-C-tag (Girbal *et al.*, 2005; Abb. A.1) abgeleitete pT-Vektor vermittelte eine messbare FbFP-basierte Fluoreszenz in rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämmen (3.1.2.2.).

Erst kürzlich wurde ein modulares Shuttle-Vektor System etabliert, welches sich u. a. durch die Nutzung verschiedener Gram-positiver Replikationsursprünge auszeichnet (Heap *et al.*, 2009). Unter Verwendung der Plasmide dieser pMTL80000-Serie konnte eine Expression der FbFP-Reporterproteine in rekombinanten *E. coli*-Zellen dargestellt werden (Abb. A.12). Jedoch wiesen lediglich *C. acetobutylicum*-Stämme, die FbFP-kodierte Plasmide des pMTL85151-Vektors enthielten eine zur pT-Serie ähnliche Expression der Reporterproteine auf (Abb. 3.11). Diese Funktionalität könnte durch den Besitz desselben Gram-positiven Replikationsursprungs (pIM13 bzw. *repL*) beider Vektoren (pT und pMTL85151) begründet werden. Obwohl die Plasmid-Stabilitäten der hier verwendeten pMTL80000-Vektoren als ähnlich beschrieben wurden (Heap *et al.*, 2009), konnte eine FbFP-Expression durch Einsatz der Plasmide pMTL82151, pMTL83151 und pMTL84151 in *C. acetobutylicum* nicht bestätigt werden. Da zudem die Expression des präferierten Pp2-Reporters mittels pMTL85151-Plasmid im Vergleich zum pT-Vektor nicht gesteigert werden konnte (Abb. 3.11), wurde der Ansatz während dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Als Alternative für die Anwendung in *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen konnte das pTChydA_{Ca}-C-tag-Plasmid (Abb. A.5) genutzt werden (3.3.2.). Dieses zeichnet sich im Vergleich zum pT-Vektor durch eine andere Antibiotika-Resistenz (Chloramphenicol/ Thiamphenicol), bei einer annähernd gleichen Plasmidgröße aus. Somit bestand ebenfalls die Möglichkeit, Integrationsstämme mit Erythromycin-Resistenzkassette hinsichtlich ihrer Promotoraktivitäten zu charakterisieren.

4.2. Anwendung des FbFP-basierten Reportersystems

Die Anwendbarkeit des hier etablierten ersten Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems für Anaerobier wurde anhand verschiedener Promotorstudien im *C. acetobutylicum* Wildtyp-Stamm und in einigen *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen dargestellt. Zudem gelang es, ein induzierbares System und ein Protokoll für *in vivo* Expressionsstudien von *C. acetobutylicum* im Hochdurchsatz zu erstellen.

Im Zuge der vorgestellten Arbeit wurden außerdem erstmals Funktionalitäten clostridieller Promotoren in *Escherichia coli* vergleichend beurteilt. Dabei stellte sich heraus, dass der Thiolasegen (*thIA*)-Promotor aus *C. acetobutylicum* und der artifizielle IPTG (Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid)-induzierbare *fac*-Promotor die stärkste Expression des FbFP-Reporterproteins in *E. coli*-Kulturen vermittelten (Abb. 3.13; Abb. 3.25). Der Aldehyd/ Alkohol-Dehydrogenasegen (*adhE2*)-Promotor bewirkte im Vergleich zum *thIA*- und *fac*-Promotor eine schwächere, jedoch immer noch starke Synthese des Reporterproteins im rekombinanten *E. coli*-Stamm (Abb. 3.19). Im Gegensatz dazu besaßen der Phosphotransbutyrylasegen (*ptb*)- und der Hydrogenasegen (*hydA*)-Promotor eine schwache, sowie der Acetoacetat-Decarboxylasegen (*adc*)-Promotor eine kaum messbare Aktivität in *E. coli* (Abb. 3.13). Entgegen der hier vorgestellten Erkenntnisse wurde in früheren Studien für den clostridiellen *adc*-Promotor eine gute bis hohe, konstante Aktivität in *E. coli* ermittelt (Petersen & Bennett, 1990; Gerischer & Dürre, 1992).

4.2.1. Promotorstudien in *C. acetobutylicum*

In einem ersten Anwendungsbeispiel (*proof of concept*) sollte die Qualität des neu etablierten *in vivo* Reportersystems anhand systematischer Promotoranalysen beurteilt werden. Hierfür wurden verschiedene clostridielle Promotoren ausgewählter Enzyme des Gärungsstoffwechsels (ThIA, Ptb, Adc, HydA) aus *C. acetobutylicum* mittels FbFP-Reporterprotein hinsichtlich ihrer Aktivität während der Batch-Kultivierung charakterisiert. Es zeigte sich, dass die neuen rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme im Vergleich zur Kontrolle (pT-Plasmid) keine signifikanten Änderungen im Wachstumsverhalten (Abb. 3.15) oder im Produktspektrum (Abb. A.13) aufwiesen, sodass der Einfluss des Reporterproteins (Pp2) auf den clostridiellen Stoffwechsel als gering eingeschätzt werden kann.

Die Acetyl-Coenzym A Acetyltransferase (Thiolase A) ist in *C. acetobutylicum* essentiell für die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA. Dabei konkurriert sie während der Säurephase (Acidogenese) mit der Phosphotransacetylase (Pta) um den vorhandenen Acetyl-CoA Pool (Wiesenborn *et al.*, 1988). Während der Lösungsmittelphase (Solventogenese) nimmt sie eine entscheidende Rolle bei der Reassimilation der gebildeten Säuren und deren Umsetzung zu den Lösungsmitteln ein (Petersen & Bennett, 1991). Die Aktivität des clostridiellen *thlA*-Promotors wurde bereits mittels verschiedener *ex vivo* Reportersysteme charakterisiert (Tummala *et al.*, 1999; Girbal *et al.*, 2003). Unter Verwendung der β -Glukuronidase (GusA) als Reporterprotein konnte eine konstant hohe Aktivität des *thlA*-Promotors während des Wachstums von *C. acetobutylicum* gezeigt werden (Girbal *et al.*, 2003). Das in dieser Arbeit erstmals *in vivo* ermittelte *thlA*-Promotoraktivitätsprofil zeigte hingegen Schwankungen in Abhängigkeit von den Wachstumsphasen (Abb. 3.15A). So konnte ein leichter Anstieg der *in vivo thlA*-Promotoraktivität während der frühen Acidogenese festgestellt werden. Innerhalb der Transitionsphase (Übergang Acido-/ Solventogenese) wurde eine Abnahme der *thlA*-Promotoraktivität dargestellt, welche mit Erreichen der Solventogenese wieder leicht zunahm und eine zur frühen exponentiellen Phase ähnliche Aktivität aufwies. Transkriptomstudien kontinuierlicher *C. acetobutylicum*-Kulturen zeigten eine vergleichbare *thlA*-Expression während der verschiedenen Wachstumsphasen (Winzer *et al.*, 2000). Zudem konnten ebenfalls erhöhte Transkripte des Gens in der stationären Phase während diverser Batch-Fermentationen dargestellt werden (Alsaker & Papoutsakis, 2005; Harris *et al.*, 2002; Tummala *et al.*, 1999). Auf Enzym-Ebene wurde während der Transitionsphase von *C. acetobutylicum* anstelle einer Verringerung der Thiolase-Aktivität ein Maximum festgestellt (Hartmanis & Gatenbeck, 1984). Ein zeitigeres Maximum der *thlA*-Promotoraktivität bzw. der *thlA*-Transkriptmenge ist jedoch aufgrund der später einsetzenden Proteinsynthese (Enzymbildung) nicht widersprüchlich. Zudem wurde eine Regulation auf genetischer Ebene vermutet (Winzer *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse unterstützen diese These. Erst kürzlich wurde die erhöhte Expression einer zweiten Thiolase (ThlB) in *C. acetobutylicum* während der Umstellung des Stoffwechsels beschrieben (Grimmler *et al.*, 2011). Es wurde eine antagonistische Expression der beiden Thiolasen postuliert. Andererseits zeigte die gezielte Überexpression des *thlA*-Gens in

C. acetobutylicum eine unerwartete Reduktion der Lösungsmittel, sowie eine verminderte Reassimilation der Säuren (Sillers *et al.*, 2009), sodass hier von einer enzymatischen Regulation ausgegangen werden kann. Dafür spricht ebenfalls die nachgewiesene Regulation der *in vivo* Thiolase-Aktivität in Abhängigkeit von der CoA-SH-Konzentration (Wiesenborn *et al.*, 1988; Mann & Lütke-Eversloh, 2012). Eine höhere Aktivität des *thIA*-Promotors im Vergleich zum *ptb*-Promotor (Girbal *et al.*, 2003) konnte unter Verwendung des in dieser Arbeit neu etablierten Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems nicht belegt werden.

Im Gegenteil, in dieser Arbeit wurde während der Charakterisierung des nativen *ptb*-Promotors aus *C. acetobutylicum* die im Vergleich stärkste Promotoraktivität der untersuchten Gene dargestellt (Abb. 3.15B). Die Phosphotransbutyrylase (Ptb) vermittelt in *C. acetobutylicum* durch Interkonversion die Bildung von Butyryl-Phosphat aus Butyryl-CoA (Wiesenborn *et al.*, 1989). Das Gen (*ptb*) wird in einem Operon mit der ebenfalls für die Butyrat-Synthese essentiellen Butyrat-Kinase (Buk) unter Verwendung eines gemeinsamen Promotors transkribiert (Cary *et al.*, 1988; Walter *et al.*, 1993). Durch Einsatz des *gusA*-Reportergens konnte die *ptb*-Promotor-aktivität von *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (früher *C. acetobutylicum*; Johnson *et al.*, 1997) in Übereinstimmung mit der für *C. acetobutylicum* durch das FbFP-basierte Reportersystem ermittelten Promotoraktivität dargestellt werden (Ravagnani *et al.*, 2000). Es wurde ein Anstieg während der Acidogenese, ein Maximum in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase, ein zweites kleineres Aktivitätsmaximum während der Transitionsphase und der Abfall der Aktivität während des stationären Wachstums gezeigt (Ravagnani *et al.*, 2000). Auch ein mit Hilfe der β -Galaktosidase (LacZ) beschriebenes *ptb*-Promotorprofil (Tummala *et al.*, 1999), *ptb*-Transkriptom-Analysen (Harris *et al.*, 2002; Alsaker & Papoutsakis, 2005; Jones *et al.*, 2008) und die Wachstumsphasen-assoziierte Ptb-Enzymaktivität (Andersch *et al.*, 1983; Hartmanis & Gatenbeck, 1984; Hüsemann & Papoutsakis, 1989; Desai & Papoutsakis, 1999) sind vergleichbar mit dem in dieser Arbeit ermittelten *ptb*-Promotorprofil. Jedoch wurde in früheren Studien eine vergleichsweise hohe Stabilität der *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* β -Galaktosidase (LacZ) im Gegensatz zur *E. coli* β -Glukuronidase (GusA) diskutiert (Girbal *et al.* 2003). Es wurde ein drastischerer Abfall der *ptb*-Promotoraktivität während der Lösungsmittelphase unter Verwendung der Reportergene *gusA* und *lucB* beschrieben

(Girbal *et al.* 2003; Feustel *et al.* 2004). Eine ebenfalls hohe Stabilität des FbFP-Reporterproteins in Analysen während der Batch-Fermentation kann hingegen ausgeschlossen werden, da ein starker Abfall der Aktivität für den *hydA*-Promotor in *C. acetobutylicum* beobachtet wurde (Abb. 3.15D). In Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten konnte festgestellt werden, dass der *ptb*-Promotor mit der frühen Acidogenese assoziiert ist. Eine Anwendung für die gezielte frühere Expression von Genen, die in *C. acetobutylicum* mit der Solventogenese assoziiert sind, kann für das *Metabolic Engineering* hinsichtlich einer gesteigerten Lösungsmittelsynthese Erfolg versprechend sein (Sillers *et al.*, 2009).

Die Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) ist ein Schlüsselenzym der Lösungsmittelbildung in *C. acetobutylicum* und katalysiert die enzymatische Umsetzung von Acetoacetat zu Aceton und CO₂ (Petersen & Bennett, 1990). Verschiedene Transkriptom- und Enzymaktivitätsstudien der Adc belegen eine Induktion der Expression während des Übergangs von der Acidogenese zur Solventogenese, wobei die Aktivität innerhalb der stationären Wachstumsphase ein konstantes Level aufweist (Winzer *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2002; Alsaker & Papoutsakis, 2005; Jones *et al.*, 2008; Grimmer *et al.*, 2011). In kontinuierlichen *C. acetobutylicum*-Kulturen wurde neben der Induktion der Adc die simultane Aceton-Bildung dargestellt (Andersch *et al.*, 1983; Hüsemann & Papoutsakis, 1989). Zudem konnte durch Verwendung des GusA-Reporterproteins eine vorwiegende Aktivität des *adc*-Promotors mit Beginn der Aceton-Produktion und ein Maximum in der späten exponentiellen Phase beschrieben werden (Girbal *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde entgegen der Transkript- und Enzymanalysen ein Abbruch der *adc*-Promotoraktivität kurz nach Erreichen des Maximums mittels *lacZ*-Reporter gen ermittelt (Feustel *et al.*, 2004). Hierbei konnte eine höhere native mRNA-Stabilität des *adc*-Gens gegenüber der des Reporterproteins nicht ausgeschlossen werden, so dass nur die eigentliche Aktivität des Promotors darstellbar war. Entgegen der zuvor beschriebenen Transkriptom-, Enzym- und Promotorstudien der Adc wurde in dieser Arbeit eine maximale Aktivität des *adc*-Promotors bereits in der späten exponentiellen Wachstumsphase von *C. acetobutylicum* gezeigt (Abb. 3.15C). Des Weiteren war eine konstante Aktivität des Promotors innerhalb der stationären Wachstumsphase bis hin zur mikroskopisch ermittelten Lyse der Zellen auffällig. Interessanterweise konnte zudem die *in vivo* Aktivität des *adc*-Promotors während der Säurephase, also bereits vor

der eigentlichen Aceton-Bildung gezeigt werden. Dieses Resultat ergab sich auch in einer früheren *ex vivo*-Analyse des Promotors (Tummala *et al.*, 1999). Die Induktion des Gens vor der Aceton-Synthese, sowie ein Unterschied im Gehalt der mRNA und der Enzymaktivität wurde ebenfalls zuvor festgestellt (Gerischer & Dürre, 1992). Girbal *et al.* (1995) registrierten eine messbare Adc-Aktivität in der Acidogenese, wobei diese innerhalb der Solventogenese wiederum stark erhöht war. Die in dieser Arbeit erstmals ermittelte spezifische *in vivo* Aktivität des *adc*-Promotors lässt den Schluss zu, dass keine Regulation des Gens auf genetischer Ebene erfolgt, obwohl in der Promotorregion Bindemotive des Regulators Spo0A identifiziert wurden (Thormann *et al.*, 2002). OA-Boxen konnten in diversen Promotorregionen von Genen, die mit Beginn der Solventogenese induziert werden, aufgefunden gemacht werden (Ravagnani *et al.*, 2000). Bereits während der exponentiellen Wachstumsphase von *C. acetobutylicum* wurde mittels FbFP-basiertem Reportersystem eine Aktivität des Promotors dargestellt, obwohl die Aceton-Synthese erst mit Beginn der Transitionsphase einsetzte. Eine Regulation auf enzymatischer Ebene durch kinetische Effekte (Substrat-Konzentrationen) und/oder andere regulatorische Mechanismen (Aktivierung/ Hemmung) wurde bereits vermutet (Hüsemann & Papoutsakis, 1989). Ebenfalls wurde eine Regulation durch z. B. Kataboliten-Repression nicht ausgeschlossen, da sich die Enzymaktivität der Adc umgekehrt proportional zur Glukose-Konzentration im Kultivierungsmedium verhält (Ballongue *et al.*, 1985; Hüsemann & Papoutsakis, 1989). Auch die Induktion der Adc aufgrund der steigenden Säurekonzentration im Medium oder aufgrund des Acetoacetats in der Zelle lässt den Schluss zu, dass eine enzymatische Regulation stattfindet (Ballongue *et al.*, 1985; Hüsemann & Papoutsakis, 1989; Petersen & Bennett, 1990). Gegen eine enzymatische Regulation der Adc spricht jedoch der fehlende Nachweis einer Expression innerhalb der Acidogenese auf Transkriptionsebene. Gerischer & Dürre (1992) demonstrierten eine transkriptionelle Regulation, obwohl keine spezifischen Erkennungssequenzen (z. B. für Sigma Faktoren) identifiziert wurden. Da der Promotor klar induzierbar ist, wurde vermutet, dass andere regulatorische Elemente enthalten sein müssen, die jedoch nicht näher spezifiziert werden konnten (Gerischer & Dürre, 1992).

Für den Hydrogenasegen (*hydA*)-Promotor wurde während dieser Arbeit durch den Einsatz des FbFP-basierten Reportersystems in *C. acetobutylicum* ein Aktivitäts-

maximum zu Beginn der Acidogenese, gefolgt von einem drastischen Abfall bis zum Übergang in die Solventogenese dargestellt (Abb. 3.15D). Dieses Aktivitätsprofil entspricht der physiologischen Funktion der Hydrogenase, die für die H₂-Produktion innerhalb des exponentiellen Wachstums verantwortlich ist (Demuez *et al.*, 2007). Dabei oxidiert sie reduziertes Ferredoxin und transferiert die Elektronen auf Protonen (H⁺). Die in dieser Arbeit dargestellte *hydA*-Promotoraktivität wurde anhand diverser Transkriptom-, Enzym- und einer Promotorstudie von HydA belegt (Kim & Zeikus, 1985; Junelles *et al.*, 1988; Girbal *et al.*, 1995; 2003; Gorwa *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2008). In aktuelleren *C. acetobutylicum* steady-state-Analysen von kontinuierlichen Kulturen konnte hingegen keine Änderungen der Transkriptmengen zwischen dem acidogenen und solventogenen Zustand ermittelt werden (Janssen *et al.*, 2010; Grimmier *et al.*, 2011; Hönicke *et al.*, 2012). Bereits Santangelo *et al.* (1995) zeigten ähnliche Ergebnisse, wobei das generelle *hydA*-Transkriptlevel eher gering war. Dementsprechend konnten kleine Änderungen der Expression nur schwer dargestellt werden, sodass eine konstante Expression postuliert wurde. Auch eine gleichbleibende enzymatische Aktivität der HydA ließ die Vermutung aufkommen, sie läge während der Solventogenese in einer inaktiven Form vor (Andersch *et al.*, 1983). Das in dieser Arbeit dargestellte Aktivitätsprofil des *hydA*-Promotors belegt jedoch deutlich eine Regulation auf genetischer Ebene, wie schon zuvor vermutet (Kim & Zeikus, 1985; Gorwa *et al.*, 1996).

Die erstmalig *in vivo* dargestellten Promotoraktivitäten von *C. acetobutylicum* belegen eindeutig die Funktionalität des neuen Fluoreszenz-basierten Reportersystems. Ein Vergleich der Daten mit den in der Literatur beschriebenen Enzymaktivität-basierten Reportersystemen (Tummala *et al.*, 1999; Girbal *et al.*, 2003; Feustel *et al.*, 2004) ergab gute Übereinstimmungen und nur vereinzelt widersprüchliche Ergebnisse. So erbrachten beispielsweise Untersuchungen des *adc*-Promotors mittels des gleichen Reporterproteins (LacZ) in zwei voneinander unabhängigen Studien verschiedene Angaben zur Stärke des Promotors. Laut Tummala *et al.* (1999) sollte dieser eine zum *thlA*-Promotor ähnliche Aktivität aufweisen. Feustel *et al.* (2004) hingegen widerlegten diese Aussage und begründeten den Unterschied mit dem Einsatz anderer Plasmid-Konstrukte, wonach die vorherige Untersuchung möglicherweise eine höhere Transkript-Stabilität aufgewiesen hätte. Ebenso konnte durch Verwendung des FbFP-basierten Fluoreszenzsystems nicht nachgewiesen werden, dass der *hydA*-Promotor die höchste Aktivität im

Vergleich zum *thlA*- und *ptb*-Promotor besaß, wie Analysen mittels GusA-Reporterprotein zeigten (Girbal *et al.*, 2003). Neben einem Einfluss des Expressionsvektors ist womöglich auch die Wahl des Kultivierungsmediums bei der Promotoranalyse entscheidend (vgl. 3.1.3.1. und 4.1.1.).

Hinsichtlich des Phänotyps rekombinanter FbFP-exprimierender *C. acetobutylicum*-Stämme konnte für Zellen, die das Reporterprotein mittels eines starken Promotors (*ptb*, *adc*) synthetisierten, bereits eine Fluoreszenz der Kolonien auf Festmedien während der Dokumentation unter Blaulicht ($E_x=365$ nm) erkannt werden (Abb. 3.16A). Obwohl auch der *hydA*-Promotor innerhalb der wachstumsphysiologischen Untersuchungen eine hohe Aktivität aufwies (Abb. 3.15), konnte durch Begutachtung der entsprechenden *C. acetobutylicum*-Kolonien unter Blaulicht keine eindeutige Fluoreszenz dargestellt werden. Ein Grund kann das Alter der Zellen gewesen sein, da der clostridielle *hydA*-Promotor eine signifikante Aktivität nur während der frühen Acidogenese zeigte. Dieses Phänomen konnte auch während der Dokumentation der rekombinanten Zellen, die zuvor gewaschen und in PBS-Puffer resuspendiert wurden, unter UV-Licht beobachtet werden (Abb. 3.16H). Die *ptb*- und *adc*-Promotoren vermittelten im Vergleich die höchste Fluoreszenz. Auch die Anfertigung von Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen erbrachte den Nachweis der Promotor-vermittelten Fluoreszenz der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme (Abb. 3.16B-G). Auffällig war hierbei die veränderte Zellmorphologie des Stammes *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)pp2. Die massive Expression des Reporterproteins vermittelt durch den *ptb*-Promotor bewirkte eine deutlich längere Zellform, die wahrscheinlich auf einen Protein-basierten metabolischen Stress der Bakterien zurückzuführen ist. Zudem schien das Fluoreszenzprotein in *Inclusion bodies* zu akkumulieren (Abb. 3.16D-E). Eine Neigung des Pp1-Proteins und dessen Derivate hierzu ist bekannt (persönliche Mitteilung: M. Puls, evocatal GmbH, Düsseldorf).

4.2.2. Promotorstudien in *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen

In den letzten Jahrzehnten der clostridiellen Aceton-Butanol-Ethanol (ABE)-Forschung lag der Hauptschwerpunkt in der Generierung von Stämmen mit einer erhöhten Lösungsmittelbildung (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Hierfür wurde u. a. das kürzlich entwickelte Clostron[®]-System verwendet, bei dem in spezifische Zielgene ein Gruppe-

II-Intron eingefügt wird (Heap *et al.*, 2010). Mit Hilfe dieser neuen Methode gelang es, diverse *C. acetobutylicum*-Stämme zu erzeugen, die sich v. a. durch ein verändertes Produktspektrum auszeichneten (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Kuit *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2012a; 2012b; Wietzke & Bahl, 2012; Cooksley *et al.*, 2012). Aktuell interessant war deshalb die Anwendung des neu etablierten Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems für die Analyse des nativen *adhE2*-Promotorprofils in sog. „ethanologischen“ *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen. Der Phänotyp dieser Stämme ließ die Vermutung aufkommen, dass der zweiten bifunktionalen Aldehyd/ Alkohol-Dehydrogenase (AdhE2) innerhalb des modifizierten Stoffwechsels eine besondere Bedeutung zukommt (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Lehmann *et al.*, 2012b; Wietzke & Bahl, 2012).

Die Enzymaktivität der AdhE2 wurde in *C. acetobutylicum*-Kulturen nachgewiesen, die sich in einer sog. „alkoholischen“ Phase befinden (Fontaine *et al.*, 2002). Entsprechend der Definition handelt es sich dabei um Kulturen, die Butanol und Ethanol, nicht aber Aceton oder die Säuren Butyrat und Acetat bilden. Zudem erfolgte die kontinuierliche Kultivierung der Zellen bei einem neutralen pH-Wert des Mediums und einem hohen Vorhandensein von NADH. Dieser Zustand kann u. a. durch den Zusatz von Methylviologen erreicht werden. Dabei vermittelt der artifizielle Elektronenüberträger durch Kontrolle der H₂-Produktion und somit der Bereitstellung von zusätzlichen Reduktionsäquivalenten (NADH) eine der „alkoholischen“ Phase ähnliche Redox-Balance in *C. acetobutylicum* (Rao & Mutharasan, 1987; Grupe & Gottschalk, 1992; Peguin *et al.*, 1994). Diese Reduktionskraft nutzen die Bakterien für die Synthese der Alkohole Butanol und Ethanol. Obwohl in jenem Zustand Butanol synthetisiert wird, wurde die Expression der entsprechenden Enzyme (BdhA, BdhB, AdhE1) nicht belegt, jedoch konnte die Butyraldehyd-/ Butanol-Dehydrogenaseaktivität der AdhE2 dargestellt werden (Fontaine *et al.*, 2002). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass das Enzym Redox-abhängig reguliert wird und die Butanol-Synthese in der „alkoholischen“ Phase vermittelt.

Neben dem *C. acetobutylicum* Wildtyp-Stamm als Referenz wurden die Integrationsstämme *C. acetobutylicum rex::int(95)*, *ptb::int(87)* und *hbd::int(69)* hinsichtlich ihrer *adhE2*-Promotoraktivität untersucht (Wietzke & Bahl, 2012; Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Lehmann *et al.*, 2012b). *C. acetobutylicum rex::int(95)* zeichnet sich

durch eine gesteigerte Ethanol-Produktion, eine frühere Butanol-Synthese und eine verringerte Aceton-Bildung aus. Zudem konnte die Enzymaktivität der AdhE2 in *C. acetobutylicum rex::int(95)* dargestellt werden (Wietzke & Bahl, 2012). Der Integrationsstamm *C. acetobutylicum ptb::int(87)* bildete während der pH-kontrollierten Fermentation deutlich gesteigerte Ethanol-Konzentrationen, die ebenfalls für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* im Vergleich zum *C. acetobutylicum* Wildtyp-Stamm erreicht wurden (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Lehmann *et al.*, 2012b). Diese „ethanologen“ Phänotypen ließen eine Änderung der Redox-Balancen der Integrationsstämme hinsichtlich einer gesteigerten Ansammlung von Reduktionsäquivalenten vermuten, sodass zur „alkoholischen“ Phase ähnliche Bedingungen vorhanden waren. Dementsprechend sollte mittels FbFP-basierten Reportersystems eine möglicherweise erhöhte *adhE2*-Promotoraktivität in den Integrationsstämmen nachgewiesen werden.

Zunächst wurde im Zuge dieser Arbeit die native *adhE2*-Promotoraktivität im *C. acetobutylicum* Wildtyp-Stamm analysiert. Es zeigte sich eine geringe, kaum vom *C. acetobutylicum* Kontrollstamm (pTC-Plasmid) zu unterscheidende Aktivität (Abb. 3.22B). Dies war zu erwarten, da die „alkoholische“ Phase bisher nur in kontinuierlichen Kulturen z. B. unter Zugabe exogener Substanzen (Methylviologen, Neutralrot), CO-Begasung oder Wachstum auf Glycerin des *C. acetobutylicum* Wildtyps nachzuweisen war (Kim *et al.*, 1984; Datta & Zeikus, 1985; Meyer *et al.*, 1985; 1986; Rao & Mutharasan, 1987; Hüsemann & Papoutsakis, 1989; Grupe & Gottschalk, 1992; Vasconcelos *et al.*, 1994; Peguin *et al.*, 1994; Girbal & Soucaille, 1994; Girbal *et al.*, 1995). Das Profil der *thlA*-Promotoraktivität als Referenz (Abb. A.14A) war vergleichbar mit dem zuvor dargestellten (Abb. 3.15A). Auch das Produktspektrum des *C. acetobutylicum* Wildtyps entsprach dem Standard (Abb. 3.22C-G). Der pH-Wert des Kultivierungsmediums stieg, nachdem er einen Wert von 4,7 erreicht hatte, bis zum Ende des Experiments auf einen Wert von 4,9 an. Die einhergehende Reassimilation der Säuren Butyrat und Acetat war ersichtlich. Des Weiteren wurden während der Solventogenese eine leichte Steigerung der Ethanol-Produktion, sowie eine deutliche Bildung von Butanol (149 mM) und Aceton (79 mM) verzeichnet.

In silico-Analysen der *upstream*-Region des *adhE2*-Gens enthüllten putative Bindestellen eines sog. *redox-sensing* transkriptionellen Repressors Rex in *C. acetobutylicum*

(Wietzke & Bahl, 2012). Außerdem konnte die Affinität des clostridiellen Rex-Proteins zur *adhE2*-Promotorregion mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) dargestellt werden. Der entsprechende *C. acetobutylicum rex::int(95)*-Stamm wies zudem eine erhöhte Expression des *adhE2*-Gens, sowie eine gesteigerte NADH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase Aktivität auf (Wietzke & Bahl, 2012). Bereits in vorangehenden Arbeiten mit anderen Mikroorganismen konnte die Verbindung von zellulären NADH/NAD⁺-Verhältnissen und einer Rex-vermittelten Regulation der Genexpression dargestellt werden (Brekasis & Paget, 2003; Schau *et al.*, 2004; Sickmier *et al.*, 2005; Larsson *et al.*, 2005; Gyan *et al.*, 2006; Reents *et al.*, 2006). Es wurde eine verminderte Bindung des Proteins an DNA-Regionen durch erhöhte NADH-Konzentrationen ermittelt. Dabei wirkt NAD⁺ als Antagonist und fördert die DNA-Komplexbildung. Die in *C. acetobutylicum rex::int(95)* indirekt nachgewiesene dereprimierte Aktivität des *adhE2*-Promotors (Wietzke & Bahl, 2012) wurde während dieser Arbeit unter Verwendung des Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems bestätigt (Abb. 3.22B; Abb. 3.21). Es konnte eine hohe *adhE2*-Promotoraktivität während der Acidogenese dargestellt werden, die verglichen mit dem *C. acetobutylicum* Wildtyp die nichtvorhandene Regulation durch Rex in dem Integrationsstamm widerspiegelt. Des Weiteren wurde ein stetiger Abfall der relativen Aktivität während des Übergangs in die Solventogenese und der stationären Phase beobachtet (Abb. 3.22B). Die dereprimierte Aktivität des *adhE2*-Promotors scheint in *C. acetobutylicum rex::int(95)* demnach antagonistisch mit der *adhE1*-Expression reguliert zu sein, die mit Beginn der Transitionsphase nachweislich induziert wird (Grimmler *et al.*, 2011). Wietzke & Bahl (2012) konnten ebenfalls für den Thiolase (*thlA*)-Promotor das *consensus*-Bindemotiv des Rex-Proteins und eine gesteigerte Thiolase-Aktivität in *C. acetobutylicum rex::int(95)* nachweisen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hingegen eine im Vergleich zum *C. acetobutylicum* Wildtyp verringerte Aktivität des *thlA*-Promotors in *C. acetobutylicum rex::int(95)* ermittelt (Abb. A.14A-B). *In silico*-Analysen des hier verwendeten *thlA*-Promotors, welcher nicht erneut aus *C. acetobutylicum* kloniert wurde, sondern bereits auf dem Ausgangsvektor pThyA_{Ca}-C-tag (Girbal *et al.*, 2005) vorhanden war, zeigten jedoch eine unvollständige Sequenz des Rex-Bindemotivs. Demnach unterlag der in dieser Arbeit untersuchte *thlA*-Promotor keiner Regulation durch Rex, weshalb keine gesteigerte Promotoraktivität nachweisbar war. Auch die Produkt-

spektren des für die *adhE2*-Promotoranalyse generierten Stammes *C. acetobutylicum rex::int(95)* pTC::P(*adhE2*)pp2 (Abb. 3.22C-G) unterschieden sich vom Parentalstamm *C. acetobutylicum rex::int(95)* deutlich. So konnte z. B. die früher einsetzende Butanol-Bildung nicht dargestellt werden (Abb. 3.22D). Die weiteren beschriebenen Tendenzen der Produktbildung von *C. acetobutylicum rex::int(95)* (Wietzke & Bahl, 2012) wurden im Ansatz erkannt, jedoch wichen die konkret publizierten Werte drastisch von den hier ermittelten ab (Versuche unabhängig voneinander dreimal durchgeführt). Als eventuelle Gründe für diese Abweichungen wird eine rasche Degeneration des Stammes *C. acetobutylicum rex::int(95)* (persönliche Mitteilung: M. Wietzke, Universität Rostock) oder eine bisher nicht beschriebene Instabilität der Integrationsmutagenese vermutet.

C. acetobutylicum ptb::int(87) besitzt ein Defizit in der Buttersäure-Synthese und ist unter normalen Kultivierungsbedingungen nicht in der Lage Aceton und nur geringe Mengen an Ethanol und Butanol zu bilden (Lehmann *et al.*, 2012b). In pH-kontrollierter Fermentation hingegen produzierte der Stamm annähernd normale Konzentrationen an Lösungsmitteln, wobei dennoch eine drastische Steigerung in der Ethanol-Synthese beobachtet wurde. Aufgrund dieses „ethanologen“ Phänotyps kann eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichts hin zu einem gesteigerten NADH-Verfügbarkeit, ähnlich der „alkoholischen“ Phase (Fontaine *et al.*, 2002), nicht ausgeschlossen werden. Demnach wurde ebenfalls eine im Vergleich zum *C. acetobutylicum* Wildtyp-Stamm gesteigerte Expression der AdhE2 vermutet. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte diese These mit Hilfe des neu etablierten Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reporter-systems detailliert untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass *C. acetobutylicum ptb::int(87)* im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Aktivität des *adhE2*-Promotors aufwies (Abb. 3.21 und Abb. 3.22B). Die Aktivität zeigte ein konstantes Level während der gesamten Batch-Fermentation, wobei während des Übergangs von der Acido- zur Solventogenese ein leichter Aktivitätsverlust erkennbar war. Aufgrund der in der exponentiellen Phase vorhandenen Aktivität des *adhE2*-Promotors besteht auch hier die Möglichkeit, dass eine Regulation durch das Rex-Protein erfolgte. Jedoch zeigte die Analyse des *adhE2*-Promotors in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* einen signifikant verschiedenen Aktivitätsverlauf zu dem für *C. acetobutylicum rex::int(95)* dargestellten. Demnach kann eine Regulation des *adhE2*-Promotors allein durch das Rex-Protein

ausgeschlossen werden. Vielmehr ergab die Charakterisierung des Promotors in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* einen erneuten Anstieg der Aktivität während der Solventogenese. Dies spricht dafür, dass der *adhE2*-Promotor speziell im Stamm *C. acetobutylicum ptb::int(87)* einer bisher unbekanntenen Regulation unterliegt. Denkbar wäre z. B. eine wie zuvor vermutete Beeinflussung verschiedener Gene durch die Akkumulation des Zwischenintermediats Butyryl-Phosphat, welches möglicherweise Hauptregulatoren des clostridiellen Stoffwechsels (Spo0A) durch Phosphorylierung aktiviert (Zhao *et al.*, 2005). Da im Stamm *C. acetobutylicum ptb::int(87)* die Phosphotransbutyrylase (Ptb) nicht exprimiert wird, entsteht in Folge weniger Butyryl-Phosphat, sodass der/ die potentiellen Regulatoren nicht aktiv sind und den *adhE2*-Promotor negativ während der Solventogenese regulieren könnten. Bezüglich des Produktspektrums von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* (Lehmann *et al.*, 2012b) wurden während dieser Arbeit vergleichbare Konzentrationen an Säuren und Lösungsmitteln ermittelt (Abb. 3.22C-G). Jedoch konnten die hier dargestellten Mengen unter pH-unkontrollierten Fermentations-Bedingungen erzielt werden, wohingegen Lehmann *et al.* (2012b) vergleichbare Werte mittels pH-kontrollierter Fermentation ermittelten. Auffällig war eine drastisch erhöhte Ethanol-Konzentration des Stammes *C. acetobutylicum ptb::int(87)* pTC::P(*adhE2*)pp2 innerhalb der vorliegenden Arbeit (Abb. 3.22G). Diese könnte in der durch das Reportergen-enthaltenen Plasmid metabolischen Last des Stammes begründet sein (Sillers *et al.*, 2009). Die Analyse des *thIA*-Promotoraktivitätsprofils von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* (Abb. A.14C) wies eine zum *C. acetobutylicum* Wildtyp verminderte Aktivität auf, welche in Übereinstimmung mit der durch Lehmann (2012) ermittelten ThIA-Enzymaktivität steht.

Der Stamm *C. acetobutylicum hbd::int(69)* zeichnet sich ebenfalls durch ein Defizit in der Buttersäure-Synthese aus (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011). Die Inaktivierung der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*hbd*) führte zu einem Phänotyp, der weniger H₂, kein Butanol und geringere Mengen Aceton, dafür jedoch hohe Konzentrationen an Ethanol produziert. Zudem wurden in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* erhöhte NADH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivitäten festgestellt, die die Vermutung nahelegen, dass speziell die AdhE2 in dem Integrationsstamm eine gesteigerte Aktivität besitzt (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011). Daher wurde die Aktivität des *adhE2*-Promotors ebenfalls in diesem „ethanologenem“ Stamm mittels FbFP-basierten

Reportersystems charakterisiert. Es konnte eine hohe Aktivität des *adhE2*-Promotors in der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 3.21; Abb. 3.22B), sowie ein langsamer Abfall während der weiteren Kultivierung von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* dargestellt werden (Abb. 3.22B). Aufgrund der Unfähigkeit dieses Stammes C₄-Körper (Butyrat, Butanol) zu bilden, besteht neben der Bildung von Laktat und H₂ lediglich die Möglichkeit Ethanol zu produzieren, um entsprechend NAD⁺ für die Glykolyse zu regenerieren. Es zeigte sich jedoch, dass *C. acetobutylicum hbd::int(69)* kaum Laktat und verringerte Mengen an H₂ synthetisierte (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011). Daraus resultierend bildete der Stamm enorme Konzentrationen an Ethanol. Insbesondere die reprimierte Aktivität des Rex-Regulators (Wietzke & Bahl, 2012) kann in Bezug auf die erhöhte NADH-Verfügbarkeit hierbei nicht ausgeschlossen werden, sodass erneut die Aktivität des *adhE2*-Promotors in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* u. a. aufgrund der Inaktivierung des Regulatorkomplexes vermutet wurde. Dennoch stehen die unterschiedlichen Ethanol-Konzentrationen von *C. acetobutylicum rex::int(95)* und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* (Abb. 3.22G) im Kontrast zur annähernd gleichen *adhE2*-Promotoraktivität (Abb. 3.22B). Im Gegensatz zu *C. acetobutylicum hbd::int(69)* ist *C. acetobutylicum rex::int(95)* in der Lage neben Ethanol auch Butanol zu bilden und somit NADH auf zweierlei Weg zu verbrauchen. Auf Grundlage dieser Erkenntnis kann nicht von einer alleinigen Regulation der *adhE2*-Expression durch Rex ausgegangen werden. Da zudem das *adhE2*-Promotoraktivitätsprofil der Butyrat-negativen Stämme *C. acetobutylicum hbd::int(69)* und *C. acetobutylicum ptb::int(87)* signifikant verschieden war, kann von einer angenommenen Regulation der Solventogenese durch das Zwischenintermediat Butyryl-Phosphat (Zhao *et al.*, 2005) ebenfalls abgesehen werden. Die Enzymaktivität der Thiolase (ThIA) in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* war vergleichend zum *C. acetobutylicum* Wildtyp deutlich reduziert (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011), hingegen zeigten sich auf Transkriptebene keine Unterschiede (Lehmann, 2012). Die in Abb. 3.21 und Abb. A.14D dargestellte Aktivität des *thIA*-Promotors für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* zeigte eine Verringerung im Vergleich zum *C. acetobutylicum* Wildtyp. Die durch Lehmann (2012) mittels RT-PCR bestimmten gleichen Transkriptmengen von *thIA* können demnach auf eine rasche Degradierung der isolierten RNA während der experimentellen Vorgehensweise zurückzuführen sein. Entsprechend ist die vergleichende Analyse von Promotoraktivitäten mittels *in vivo*

Reportersystemen deutlich spezifischer. Das Produktspektrum von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* konnte innerhalb dieser Arbeit bestätigt werden. So bildete der Stamm weder Butyrat noch Butanol (Abb. 3.22C-D). Ein Wiederanstieg des pH-Werts des Kultivierungsmediums wurde ebenfalls nicht beobachtet (Abb. 3.22H). Jedoch konnte die Reassimilation von Acetat und die einhergehende Aceton-Produktion dokumentiert werden (Abb. 3.22E-F). Auffällig waren die allgemein höheren Alkohol-Konzentrationen. So wurde durch Lehmann & Lütke-Eversloh (2011) eine maximale Ethanol-Konzentration von 16,2 g/l (352 mM) beschrieben und in dieser Arbeit ein maximaler Endwert von 788 mM erreicht (Abb. 3.22G). Diese mehr als zweifach gesteigerte Ethanol-Produktion kann eventuell auf die metabolische Last des hier enthaltenen Plasmids zurückzuführen sein (Sillers *et al.*, 2009), da eine mitgeführte Plasmid-Kontrolle (pTC) in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* ebenfalls ähnliche Ethanol-Konzentrationen erreichte.

Während der hier vorgestellten Promotoraktivitätsanalysen rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme wurden signifikante Unterschiede der Promotor-vermittelten Fluoreszenz zu Beginn (direkt nach Generierung der Stämme) und im späteren Verlauf der Charakterisierung (z. B. nach Abschluss der wachstumsphysiologischen Untersuchungen) festgestellt (vgl. Abb. 3.20, Abb. 3.21 und Abb. 3.22B). Da dieses Phänomen jedoch nicht eingehend untersucht wurde, kann keine definitive Aussage zur Ursache getroffen werden. Naheliegend wäre die Degradierung der *C. acetobutylicum*-Integrationsstämme im Zuge der Charakterisierungen, da die Stabilität und ein möglicher Einfluss der Mutagenese selbst bisher nur unzureichend beschrieben wurden. Die Promotor-vermittelte Fluoreszenz unterlag jedoch ebenfalls im *C. acetobutylicum* Wildtyp signifikanten Schwankungen, sodass ein Mutations-spezifisches Verhalten ausgeschlossen werden kann. Zudem ergaben Überlegungen zu einem angenommenen *quorum sensing* Effekt, wonach die bakterielle Genexpression in Abhängigkeit von der Dichte der Zellpopulation reguliert werden kann (Fuqua *et al.*, 1994), keinen abschließenden Aufschluss. Die erwähnten Schwankungen der Promotoraktivitäten wurden zu Beginn und im späteren Verlauf der Arbeit in verschiedenen Kultur-Volumina (10 ml, 200 ml) ermittelt. Demnach kann eine höhere Zelldichte während der Kultivierung im größeren Volumen nicht ursächlich für dieses Phänomen sein.

Auch die ca. zweifach erhöhte Fluoreszenz vermittelt durch den nativen *thIA*-Promotor im *C. acetobutylicum* Wildtyp, die durch Verwendung der pTC-Plasmidserie (Abb. 3.20) anstelle des pT-Vektors (Tab. 3.2) erreicht wurde, kann nicht hinreichend erläutert werden. Der zur *thIA*-Promotoranalyse in *C. acetobutylicum* verwendete pT-Vektor unterschied sich vom hier verwendeten Plasmid pTC::P(*thIA*)*pp2* lediglich im Austausch eines Resistenzgens (pT: Erythromycin; pTC: Chloramphenicol/ Thiamphenicol).

4.2.3. Ein induzierbares Expressionssystem für *C. acetobutylicum*

Induzierbare Expressionssysteme werden traditionell für die genetische Manipulation mittels kontrollierter Genexpression unter Verwendung von chemischen oder physikalischen Induktoren verwendet (Terpe, 2006). Zudem birgt die Nutzung dieser Systeme Vorteile in der konventionellen Charakterisierung von Genfunktionen oder der Produktion medizinisch bzw. industriell relevanter Proteine und Enzyme (Terpe, 2006). Auch die Stammoptimierung von Mikroorganismen durch die spezifische Expression von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels kann mittels eines geeigneten Expressionssystems erreicht werden. Ein effektives System zeichnet sich dabei durch mehrere Eigenschaften aus: (i) eine einfache Induktion, d. h. Verzicht auf kostenintensive Chemikalien oder Verwendung spezieller Kultivierungsmedien, (ii) eine geringe Grundexpression in Abwesenheit des Induktors, (iii) eine regulierbare Spannweite der Aktivität basierend auf der eingesetzten Induktor-Konzentration und (iv) eine zeitnahe Reaktion des Systems auf den Induktor, die für Analysen von kurzweiligen Effekten der Genprodukte auf den Zellmetabolismus essentiell ist. Insbesondere Punkt (ii) und (iii) erlauben dabei die starke Expression von homologen oder heterologen Proteinen für potentielle Aufreinigungen oder Analysen hinsichtlich phänotypischer Veränderungen des Organismus.

Für *C. acetobutylicum* wurde 2001 ein erstes induzierbares Expressionssystem beschrieben, bei dem für den nativen *recA*-Promotor eine Induzierbarkeit durch UV-Bestrahlung gezeigt werden konnte (Nuyts *et al.*, 2001). Dennoch ließ sich unter Verwendung dieses Systems lediglich eine maximale Expressions-Steigerung des *lacZ*-Reporter gens von 20-30 % ermitteln. Auch die Etablierung eines durch Xylose induzierbaren Systems wies einige unvorteilhafte Eigenschaften, wie das Vorhandensein von Xylose als alleinige Kohlenstoffquelle auf (Girbal *et al.*, 2003). Obwohl dabei eine 17-

fach gesteigerte Expression mittels GusA-Reporter dargestellt wurde, wird *C. acetobutylicum* meist in Glukose-haltigen Medien, wie RCM (Hirsch & Grinsted, 1954), CGM (Roos *et al.*, 1985) oder 2TYG (Wiesenborn *et al.*, 1988), kultiviert, was die Anwendung des Systems für *C. acetobutylicum* erschweren würde. Erst kürzlich konnte die induzierbare Expression in *C. acetobutylicum* durch Einsatz eines *tetO*-Operators und *tetR*-Repressorgens des *E. coli* Tn10 Transposons dargestellt werden (Dong *et al.*, 2012). Dieses System wies eine geringe Grundexpression in Abwesenheit des Induktors (Anhydrotetracyclin, aTc) und eine 41-fache Steigerung der Expression in *C. acetobutylicum* auf. Jedoch zeigte sich trotz der Möglichkeit einer Konzentrations-abhängigen Induktion durch aTc ein negativer Effekt auf das Wachstum der Bakterien mit steigendem aTc-Gehalt.

Für die Etablierung des in dieser Arbeit beschriebenen induzierbaren Expressionssystems (pTi) wurden der artifizielle IPTG (Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid)-induzierbare *fac*-Promotor und das *lacI*-Repressorgen genutzt (Heap *et al.*, 2007). Durch Zugabe von IPTG erfolgt die Hemmung des LacI-Repressors, sodass eine *fac*-Promotorvermittelte Expression des Gens ermöglicht wird. Die Etablierung des Systems wurde unter Verwendung des FbFP-Reporterproteins Pp2 durchgeführt. Es konnte eine geringe Grundexpression (max. 2,5-fach) in Abwesenheit des Induktors (IPTG) im Vergleich zur Kontrolle (pT-Plasmid) in *C. acetobutylicum* ermittelt werden (Abb. 3.26). Hingegen zeigte *E. coli* pTi eine deutliche Grundfluoreszenz des Reporterproteins (Abb. 3.25). Diese beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der schwachen Aktivität des *ptb*-Promotors in *E. coli* (Abb. 3.13), der ebenfalls auf dem inserierten *lacI*-Genfragment enthalten war und die Expression des Repressors vermittelte (3.4.1.1.). Demnach bedingt die geringe *ptb*-Promotoraktivität eine unzureichende Expression des Repressors in *E. coli*. Außerdem zeigten Untersuchungen zur Induzierbarkeit von *C. acetobutylicum* pTi mittels 1 mM IPTG eine 4,5-fache Steigerung der Expression des Fluoreszenzproteins Pp2 (Abb. 3.26). Erste Analysen zur zeitabhängigen Induktion des Systems unter Zugabe von ebenfalls 1 mM IPTG belegten eine signifikant gesteigerte Expression nach 60 min (1,5-fach), 120 min (2,6-fach) und 180 min (3-fach). Ein weiterer Anstieg der Expression ist zu erwarten, weshalb für eine genauere Charakterisierung dieses neuen induzierbaren Systems Zeit- und Wachstums-abhängige Versuche durchgeführt werden sollten. Es kann angenommen werden, dass *C. acetobutylicum*

pTi während der wachstumsphysiologischen Untersuchung ohne Zugabe von IPTG mit Beginn der Transition eine gesteigerte Expression des Fluoreszenzproteins Pp2 aufweist, da der LacI-Repressor unter Kontrolle des *ptb*-Promotors steht, der nachgewiesener Weise während der Solventogenese an Aktivität verliert (Abb. 3.15B). Heap *et al.* (2007) konnten unter Einsatz des *catP*-Reportergens eine maximal 10-fache Steigerung der Expression des induzierbaren Systems ermitteln. Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Korrelation der eingesetzten Induktorkonzentration und der resultierenden Expression durchgeführt (Abb. A.16). Es konnte jedoch keine Konzentrations-abhängige Expressions-Steigerung dargestellt werden. Da diese Ergebnisse auf Messungen nach jeweils dreistündiger Inkubation beruhen, wäre es sinnvoll, die Expression über einen längeren Zeitraum unter Zugabe verschiedener IPTG-Konzentrationen zu überprüfen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter Verwendung eines z. B. höheren IPTG-Gehalts eine frühere Induktion möglich ist.

Außerdem konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit eine leicht gesteigerte Aktivität des *fac*-Promotors (pT::P(*fac*)*pp2*; Abb. 3.25) im Vergleich zum *thIA*-Promotor (Abb. 3.13) in rekombinanten *E. coli*-Zellen ermittelt werden. Der Stamm *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)*pp2*, welcher das *pp2*-Reportergen unter Kontrolle des *fac*-Promotors (ohne *lacI*) exprimiert, wies die höchste Fluoreszenz der in dieser Arbeit untersuchten rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme auf (Abb. 3.26). Auf Grundlage dieser Ergebnisse bietet das Plasmid pT::P(*fac*)*pp2* eine Alternative für die Überexpression clostridieller Proteine in *E. coli* bzw. *C. acetobutylicum* zu den etablierten Vektoren. So erfolgt die gezielte Expression z. B. mittels pThydA_{Ca}-C-tag-Vektor (Girbal *et al.*, 2005) unter Kontrolle des *thIA*-Promotors. Der *fac*-Promotor vermittelte im Vergleich zum *thIA*-Promotor eine ca. 7-fach höhere Expression in rekombinanten *C. acetobutylicum*-Zellen (vgl. Abb. 3.14 und Abb. 3.26).

Die hier vorgestellte Entwicklung des induzierbaren Expressionssystems pTi für *C. acetobutylicum* ergab potentielle Ansätze für eine abschließende Etablierung und zukünftige Anwendungen. So wurde die prinzipielle Induzierbarkeit des Systems in *C. acetobutylicum* belegt und erste Untersuchungen zur einzusetzenden IPTG-Konzentration und zeitabhängigen Induktion dargestellt. Des Weiteren besitzt das System keine speziellen Anforderungen an das *C. acetobutylicum*-Kultivierungsmedium. Eine mögliche Regulation der Expression durch Variation der Induktorkonzentration ist

nicht ausgeschlossen. Es konnte eine geringe Grundexpression in Abwesenheit von IPTG dargestellt werden, die evtl. weiter verringert werden kann. Denkbar ist die Insertion des *tetO*-Operators (Dong *et al.*, 2012) anstelle des *lacO*-Operators in den *C. pasteurianum fdx*-Promotor (Fox *et al.*, 1996), sowie der Austausch des LacI- gegen den TetR-Repressor (Dong *et al.*, 2012). Unter diesen Voraussetzungen besteht die Möglichkeit ein weitaus sensitiveres induzierbares System zu erstellen, da der erwiesenermaßen starke TetR-Repressor (Dong *et al.*, 2012) zusammen mit dem ebenfalls starken *fdx*-Promotor interagieren würde.

4.2.4. Das Fluoreszenz-Hochdurchsatz-Screening

Im Verlauf der beschriebenen Arbeit ergab sich die Möglichkeit, die generierten rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme für die erstmalige Entwicklung eines Fluoreszenz-basierten *in vivo* Screenings im Hochdurchsatz zu nutzen. Bezüglich des *Metabolic Engineerings* erhöht ein solches Verfahren im Hochdurchsatz die direkte Evolution von mikrobiellen Stämmen und reduziert zudem die oftmals aufwendige Handhabung von *in vitro* Untersuchungen (Dietrich *et al.*, 2010). Des Weiteren können durch den Übergang von einer *in vitro*, Enzym-gekoppelten Produktanalyse hin zur *in vivo* Analyse signifikante Vorteile, nicht nur im Hinblick auf den Durchsatz, sondern auch auf die damit einhergehenden Kosten erreicht werden (Dietrich *et al.*, 2010). Generell bietet ein solches System einen Kompromiss an Genauigkeit und technischer Durchführbarkeit für die Untersuchung großer Populationen und ermöglicht dabei das Durchmusterung in Bezug auf besondere Eigenschaften von Zellen oder Proteinen (Sui & Wu, 2007; Dietrich *et al.*, 2010).

Die in dieser Arbeit analysierten rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme zeichneten sich durch deutlich voneinander abgegrenzte Promotor-basierte Fluoreszenzprofile (Abb. 3.15) und Aktivitäten (Abb. 3.14) aus. Zudem gelang es, entsprechende Kolonien bereits teilweise auf Agarplatten nach Blaulichtbestrahlung zu differenzieren (Abb. 3.16A), sodass gute Voraussetzungen für die Entwicklung eines Fluoreszenz-basierten Screenings im Hochdurchsatz vorlagen.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde zunächst ein Protokoll für Fluoreszenzmessungen von *C. acetobutylicum*-Zellsuspensionen in Mikrokulturen entwickelt. Die Differenzierung der fluoreszierenden Varianten im Hochdurchsatz wurde durch die Einstel-

lung diverser Messparameter (Tab. 3.3) am SpectraMaxM2^e Mikrotiterplattenreader (Molecular Devices, Ismaning) spezifiziert. Eine reproduzierbare Unterscheidung von *C. acetobutylicum* pT und *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)pp2 belegte erstmals die potentielle Anwendbarkeit für eine Analyse im Hochdurchsatz bezüglich Promotor-vermittelter Fluoreszenzen (Abb. 3.28). Diese wurde anschließend anhand der zuvor erstellten Pp2-exprimierenden *C. acetobutylicum*-Varianten (*thlA*-, *ptb*-, *adc*-, *hydA*- und *fac*-Promotor) verifiziert (Abb. 3.29). Die deutliche Differenzierung der Promotor-vermittelten Fluoreszenzen zur Kontrolle (pT-Plasmid), sowie zwischen den jeweiligen Pp2-exprimierenden *C. acetobutylicum*-Stämmen bestätigte die vorangegangenen Ergebnisse. Die im Hochdurchsatz ermittelten relativen Promotoraktivitäten wichen zum Teil von den Werten vorheriger Messungen ab (Abb. 3.29; Abb. 3.14). Dies beruht evtl. auf der Anzucht und Inkubation in Mikrokulturen, wonach eine vergleichende Übereinstimmung zu den in größeren Kulturen erzielten Ergebnissen unwahrscheinlich war. Zudem wurde im Zuge der Untersuchungen im Hochdurchsatz eine relativ hohe Standardabweichung für die *ptb*-, *adc*-, *hydA*- und *fac*-Promotor-basierte Fluoreszenz dargestellt (Abb. 3.29). Ursächlich war hierbei sicherlich ein ungleichmäßiges Zellwachstum in Abhängigkeit von der Inokulationszellmenge bzw. die Tatsache, dass für diese Promotoren zuvor eine Abhängigkeit der Aktivität von den Wachstumsphasen aufgezeigt wurde (Abb. 3.15). *C. acetobutylicum* pT::P(*thlA*)pp2 wies hingegen während der Messungen in Mikrokulturen kaum Unterschiede der Fluoreszenz auf (Abb. 3.29), die in Übereinstimmung mit dem zuvor dargestellten, kaum Schwankungen aufweisenden, Promotorprofil korrelierten (Abb. 3.15A).

In Anbetracht der erzielten Resultate bietet das hier vorgestellte Verfahren die Grundlage und potentielle Möglichkeiten für ein Screening von fluoreszierenden *C. acetobutylicum*-Varianten im Mikrokultur-Format. Eine naheliegende Anwendung ist die zukünftige Analyse von clostridiellen Promotobibliotheken im Hochdurchsatz, wobei im Speziellen die Identifikation von Wachstumsphasen-abhängigen, Butanol-induzierbaren und Redox-abhängigen Promotoren vorstellbar ist.

4.3. Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde ein Fluoreszenz-basiertes *in vivo* Reporter-system für *C. acetobutylicum* analysiert und optimiert. Zudem konnte die erfolgreiche Anwendbarkeit anhand mehrerer Beispiele belegt werden. Die so erhaltenen Daten zeigten gute Übereinstimmungen mit den bisher in der Literatur publizierten Ergebnissen. Demnach bietet diese neue molekulargenetische Methode Perspektiven für weitere Anwendungen in der clostridiellen Forschung.

Denkbar ist dabei u. a. die Entwicklung instabilerer Varianten des Pp2-Reporterproteins für anaerobe Applikationen in *C. acetobutylicum*. Es wird vermutet, dass das Fluoreszenzprotein eine stabile und andauernde Halbwertszeit besitzt, da in Proben über einen Zeitraum von 24 Stunden keine Änderung der Fluoreszenz erkennbar war (3.1.3.2.). Eine hohe Stabilität des Reporterproteins limitiert jedoch signifikant die *in vivo real-time* Transkriptionsanalysen (Initiation, Termination). Auch das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) und die bakterielle Luziferasen (LuxA, LuxB) zeigten diese Problematik. Durch Anfügen einer kurzen C-terminalen Peptidsequenz (*ssrA*-Genprodukt) an das jeweilige Reporterprotein gelang es, die Halbwertszeiten zu senken (Andersen *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 2007). Die angefügte Sequenz, die normalerweise unvollständige oder beschädigte mRNA kenntlich macht, wird durch Proteasen erkannt sodass das entsprechende Protein abgebaut wird (Keiler *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1998). Ushida *et al.* (1994) konnten homologe Sequenzen des *ssrA*-Gens in diversen Gram-negativen und Gram-positiven Mikroorganismen nachweisen. Somit besteht die Möglichkeit, ebenfalls für die hier etablierten clostridiellen FbFP-Reporter instabilere Varianten für *C. acetobutylicum* zu entwickeln. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass der C-Terminus der FbFPs mit dem Chromophor (FMN) interagiert (Jentzsch *et al.*, 2009).

Auch eine gesteigerte Fluoreszenz des anaeroben FbFP-basierten Reporterproteins scheint möglich, da bereits in *Candida albicans* die Fusion zweier FbFP-Proteine (sog. „Tandems“) zu einer sichtbar erhöhten Fluoreszenz führte (Tielker *et al.*, 2009).

Des Weiteren konnte die erfolgreiche Anwendung der FbFPs für die Entwicklung eines genetisch kodierten FRET (*Förster resonance energy transfer*)-basierten Biosensors zur Dokumentation der molekularen O₂-Konzentration in lebenden Zellen dargestellt werden (Potzkei *et al.*, 2012). Generell basiert FRET auf Fusionsproteinen, die aus zwei

Fluoreszenz-Domänen mit verschiedenen Chromophoren bestehen. Diese weisen spektrale Überlagerungen zwischen der Absorptionswellenlänge der Akzeptor-Domäne und der Emissionswellenlänge der Donor-Domäne auf. Potzkei *et al.* (2012) nutzten neben dem FbFP das YFP (*yellow fluorescence protein*), wobei das FbFP als O₂-unabhängiger Donor und das YFP als O₂-sensitiver Akzeptor dienten. Dementsprechend zeigte der Biosensor eine Fluoreszenz in Gegenwart von O₂, jedoch keine unter O₂-Abwesenheit. Folglich bietet diese Methode Potential für die begleitende Analyse von *C. acetobutylicum*-Kulturen unter O₂-Stress oder von O₂-toleranteren Stämmen, wie z. B. *C. acetobutylicum* Δ *perR* (Hillmann *et al.*, 2008; 2009).

Auch der Einsatz der FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Technik z. B. für die Analyse von verschiedenen *C. acetobutylicum*-Stämmen hinsichtlich Wachstumsphasen-assoziiierter oder induzierbarer Promotoren ist nicht ausgeschlossen. Diese direkte Detektion von Fluoreszenzproteinen bietet annähernd ideale Merkmale für Analysen im Hochdurchsatz und wurde bisher im Protein- und *Metabolic Engineering* gut untersucht (Tracy *et al.*, 2008; Dietrich *et al.*, 2010).

Um in zukünftigen Arbeiten Probleme Plasmid-basierter Effekte, wie z. B. Titrations-effekte der klonierten auf die chromosomalen Promotoren (Mermelstein & Papoutsakis, 1993; Tummala *et al.*, 2003; Sillers *et al.*, 2009) oder Verfälschungen der Promotoraktivitäten aufgrund von ungenauen Angaben der zellulären Plasmidanzahl entgegenzuwirken, wäre es sicher ebenfalls sinnvoll das Reporter-gen mittels *knock-in*-Strategien direkt in das *C. acetobutylicum*-Genom zu integrieren (Al-Hinai *et al.*, 2012; Heap *et al.*, 2012).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die hier beschriebenen Anwendungsbeispiele vielfältige Einsatzmöglichkeiten des Fluoreszenz-basierten *in vivo* Reportersystems in *C. acetobutylicum* aufgezeigt haben. Ähnlich wie die zahlreichen Beispiele für GFP-Anwendungen können auch die FbFPs bei unterschiedlichen wissenschaftlichen Fragestellungen genutzt werden - mit dem Unterschied dass die FbFPs auch in Clostridien und anderen Anaerobiern *in vivo*-Aktivität besitzen.

5. Zusammenfassung

1. Es wurde ein FbFP-basiertes *in vivo* Reportersystem für den obligat anaeroben Mikroorganismus *Clostridium acetobutylicum* unter Verwendung des Pp2-Proteins etabliert. Auf Grundlage von Fluoreszenz-Optimierungen hinsichtlich wachstumsphysiologischer Kriterien (Medienzusammensetzung und Temperatur-Einfluss) konnte ein Protokoll zur Charakterisierung von clostridiellen Promotoraktivitäten erstellt werden. Die Fluoreszenz war auf molekularer Ebene durch einen gezielten Aminosäureaustausch (Tyr112Ala) nicht steigerungsfähig. Makro- und mikroskopische Fluoreszenz-Darstellungen der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme bestätigten die Funktionalität des Systems.
2. Vergleichende Promotorstudien zur Charakterisierung des neuen *in vivo* Reportersystems in *C. acetobutylicum* erbrachten den Funktionsnachweis (*proof of concept*). In Gegenüberstellung mit bereits etablierten *ex vivo* Reportersystemen konnten ähnliche Resultate zur Aktivität der clostridiellen *thlA*-, *ptb*-, *adc*- und *hydA*-Promotoren während des mikrobiellen Wachstums erzielt werden.
3. Wachstumsphysiologische Charakterisierungen zur *adhE2*-Promotoraktivität in den *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen *rex::int(95)*, *ptb::int(87)* und *hbd::int(69)* belegten eine dereprimierte Aktivität des Promotors im Vergleich zum *C. acetobutylicum* Wildtyp-Stamm. Das Aktivitätsprofil des *adhE2*-Promotors von *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* unterschied sich deutlich von den anderen untersuchten *C. acetobutylicum*-Integrationsstämmen.
4. Auf Grundlage des artifiziellen *fac*-Promotors und des *lacI*-Repressorgens konnte ein induzierbares Expressionssystem für *C. acetobutylicum* (pTi) entwickelt werden. Unter Verwendung des *pp2*-Reportergens wurde die Induzierbarkeit visualisiert.

5. Abschließend konnte eine semi-quantitative Screening-Methode zur Analyse von Fluoreszenz-Varianten im Hochdurchsatz erstellt werden. Die gute Differenzierung der erstellten *pp2*-exprimierenden *C. acetobutylicum*-Stämme belegte die Anwendbarkeit dieses neuen Verfahrens für zukünftige Promotorstudien im Mikrotiterplatten-Format.

6. Literaturverzeichnis

- Al-Hinai, M. A., A. G. Fast, E. T. Papoutsakis.** 2012. Novel system for efficient isolation of *Clostridium* double-crossover allelic exchange mutants enabling markerless chromosomal gene deletions and DNA integration. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 8112-8121.
- Allen, M. S., J. R. Wilgus, C. S. Chewing, G. S. Sayler, M. L. Simpson.** 2007. A destabilized bacterial luciferase for dynamic gene expression studies. *Systems and Synthetic Biology* **1**: 3-9.
- Alsaker, K. V., E. T. Papoutsakis.** 2005. Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* **187**: 7103-7118.
- Alsaker, K. V., C. J. Paredes, E. T. Papoutsakis.** 2005. Design, Optimization and Validation of Genomic DNA Microarrays for Examining the *Clostridium acetobutylicum* Transcriptome. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **10**: 432-443.
- Alsaker, K. V., C. Paredes, E. T. Papoutsakis.** 2010. Metabolite Stress and Tolerance in the Production of Biofuels and Chemicals: Gene-Expression-Based Systems Analysis of Butanol, Butyrate, and Acetate Stresses in the Anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering* **105**: 1131-1147.
- Andersch, W., H. Bahl, G. Gottschalk.** 1983. Level of Enzymes Involved in Acetate, Butyrate, Acetone and Butanol Formation by *Clostridium acetobutylicum*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**: 327-332.
- Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjørn, M. Givskov, S. Molin.** 1998. New Unstable Variants of Green Fluorescent Protein for Studies of Transient Gene Expression in Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2240-2246.
- Ballongue, J., J. Amine, E. Masion, H. Petitdemange, R. Gay.** 1985. Induction of acetoacetate decarboxylase in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Letters* **29**: 273-277.
- Bertram, J.** 1989. Entwicklung eines Systems zum DNA-Transfer und zur Transposon-Mutagenese für *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Birnboim, H. C., J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.
- Borden, J. R., E. T. Papoutsakis.** 2007. Dynamics of Genomic-Library Enrichment and Identification of Solvent Tolerance Genes for *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3061-3068.

- Bradford, M. M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brekasis, D., M. S. B. Paget.** 2003. A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The EMBO Journal* **22**: 4856-4865.
- Breznak, J. A., R. N. Costilow.** 1994. Physiochemical factors of growth. In: Methods of general and molecular bacteriology. (Gerhardt, Ed.) Washington DC, USA: American Society for Microbiology. 137-154.
- Bullifent, H. L., A. Moir, R. W. Titball.** 1995. The construction of a reporter system and use for the investigation of *Clostridium perfringens* gene expression. *FEMS Microbiology Letters* **131**: 99-105.
- Cai, X., G. N. Bennett.** 2011. Improving the *Clostridium acetobutylicum* butanol fermentation by engineering the strain for co-production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38**: 1013-1025.
- Cary, J. W., D. J. Petersen, E. T. Papoutsakis, G. N. Bennett.** 1988. Cloning and Expression of *Clostridium acetobutylicum* Phosphotransbutyrylase and Butyrate Kinase Genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**: 4613-4618.
- Chester, N., D. R. Marshak.** 1993. Dimethyl Sulfoxide-Mediated Primer T_m Reduction: A Method for Analyzing the Role of Renaturation Temperature in the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* **209**: 284-290.
- Cooksley, C. M., Y. Zhang, H. Wang, S. Redl, K. Winzer, N. P. Minton.** 2012. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway. *Metabolic Engineering* **14**: 630-641.
- Datta, R., J. G. Zeikus.** 1985. Modulation of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation by Carbon Monoxide and Organic Acids. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 522-529.
- Davis, T. O., I. Henderson, J. K. Brehm, N. P. Minton.** 2000. Development of a Transformation and Gene Reporter System for Group II, Non-Proteolytic *Clostridium botulinum* Type B Strains. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**: 59-69.
- Demuez, M., L. Cournac, O. Guerrini, P. Soucaille, L. Girbal.** 2007. Complete activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners. *FEMS Microbiology Letters* **275**: 113-121.
- Desai, R. P., E. T. Papoutsakis.** 1999. Antisense RNA Strategies for Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 936-945.

- Dietrich, J. A., A. E. McKee, J. D. Keasling.** 2010. High-Throughput Metabolic Engineering: Advances in Small-Molecule Screening and Selection. *Annual Review of Biochemistry* **79**: 563-590.
- Dong, H., W. Tao, Y. Zhang, Y. Li.** 2012. Development of an anhydrotetracycline-inducible gene expression system for solvent-producing *Clostridium acetobutylicum*: A useful tool for strain engineering. *Metabolic Engineering* **14**: 59-67.
- Dower, W. J., J. F. Miller, C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**: 6127-6145.
- Drepper, T., F. Circolone, A. Heck, U. Krauss, K.-E. Jaeger.** 2007b. Bakterien sehen Blau-Neues über LOV-Photorezeptoren. *BIOspektrum* **4**: 361-363.
- Drepper, T., T. Eggert, F. Circolone, A. Heck, U. Krauss, J.-K. Guterl, M. Wendorff, A. Losi, W. Gärtner, K.-E. Jaeger.** 2007a. Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nature Biotechnology* **25**: 443-445.
- Dürre, P.** 2008. Fermentative Butanol Production: Bulk Chemical and Biofuel. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**: 353-362.
- Ezeji, T., C. Milne, N. D. Price, H. P. Blaschek.** 2010. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1697-6712.
- Feustel, L., S. Nakotte, P. Dürre.** 2004. Characterization and Development of Two Reporter Gene Systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 798-803.
- Fontaine, L., I. Meynial-Salles, L. Girbal, X. Yang, C. Croux, P. Soucaille.** 2002. Molecular Characterization and Transcriptional Analysis of *adhE2*, the Gene Encoding the NADH-Dependent Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase Responsible for Butanol Production in Alcohologenic Cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* **184**: 821-830.
- Fox, M. E., M. J. Lemmon, M. L. Mauchline, T. O. Davis, A. J. Giaccia, N. P. Minton, J. M. Brown.** 1996. Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: *In vitro* activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Therapy* **3**: 173-178.
- Fuqua, W. C., S. C. Winans, E. P. Greenberg.** 1994. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriology* **176**: 269-275.
- Gerischer, U., P. Dürre.** 1992. mRNA Analysis of the *adc* Gene Region of *Clostridium acetobutylicum* During the Shift to Solventogenesis. *Journal of Bacteriology* **174**: 426-433.

- Girbal, L., C. Croux, I. Vasconcelos, P. Soucaille.** 1995. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiology Reviews* **17**: 287-297.
- Girbal, L., I. Mortier-Barrière, F. Raynaud, C. Rouanet, C. Croux, P. Soucaille.** 2003. Development of a Sensitive Gene Expression Reporter System and an Inducible Promoter-Repressor System for *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4985-4988.
- Girbal, L, P. Soucaille.** 1994. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as Revealed by Mixed-Substrate Steady-State Continuous Cultures: Role of NADH/NAD Ratio and ATP Pool. *Journal of Bacteriology* **176**: 6433-6438.
- Girbal, L., G. von Abendroth, M. Winkler, P. M. C. Benton, I. Meynial-Salles, C. Croux, J. W. Peters, T. Happe, P. Soucaille.** 2005. Homologous and Heterologous Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and Characterization of Purified Clostridial and Algal Fe-Only Hydrogenases with High Specific Activities. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2777-2781.
- Gorwa, M. F., C. Croux, P. Soucaille.** 1996. Molecular Characterization and Transcriptional Analysis of the Putative Hydrogenase Gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* **178**: 2668-2675.
- Green, E. M., G. N. Bennett.** 1996. Inactivation of an Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase Gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-58**: 213-221.
- Grimmler, C., H. Janssen, D. Krauße, R.-J. Fischer, H. Bahl, P. Dürre, W. Liebl, A. Ehrenreich.** 2011. Genome-Wide Gene Expression Analysis of the Switch Between Acidogenesis and Solventogenesis in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **20**: 1-15.
- Grupe, H., G. Gottschalk.** 1992. Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in Continuous Culture and Presentation of a Model for Shift Induction. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3896-3902.
- Gyan, S., Y. Shiohira, I. Sato, M. Takeuchi, T. Sato.** 2006. Regulatory Loop between Redox Sensing of the NADH/NAD⁺ Ratio by Rex (YdiH) and Oxidation of NADH by NADH Dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **188**: 7062-7071.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.
- Harris, L., N. Welker, E. T. Papoutsakis.** 2002. Northern, Morphological, and Fermentation Analysis of *spo0A* Inactivation and Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* **184**: 3586-3597.

- Hartmanis, M. G., S. Gatenbeck.** 1984. Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Applied and Environmental Microbiology* **47**: 1277-1283.
- Heap, J. T., M. Ehsaan, C. M. Cooksley, Y.-K. Ng, S. T. Cartman, K. Winzer, N. P. Minton.** 2012. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic Acids Research* **40**: e59.
- Heap, J. T., S. A. Kuehne, M. Ehsaan, S. T. Cartman, C. M. Cooksley, J. C. Scott, N. P. Minton.** 2010. The Clostron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *Journal of Microbiological Methods* **80**: 49-55.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter, N. P. Minton.** 2007. The Clostron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods* **70**: 452-464.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, N. P. Minton.** 2009. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *Journal of Microbiological Methods* **78**: 79-85.
- Hillmann, F., C. Döring, O. Riebe, A. Ehrenreich, R.-J. Fischer, H. Bahl.** 2009. The Role of PerR in O₂-Affected Gene Expression of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* **191**: 6082-6093.
- Hillmann, F., R.-J. Fischer, F. Saint-Prix, L. Girbal, H. Bahl.** 2008. PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Molecular Microbiology* **68**: 848-860.
- Hirsch, A., E. Grinsted.** 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *Journal of Dairy Research* **21**: 101-110.
- Hönicke, D., H. Janssen, C. Grimmmler, A. Ehrenreich, T. Lütke-Eversloh.** 2012. Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol:acetone ratios. *New Biotechnology* **29**: 485-493.
- Hüsemann, M. W., E. T. Papoutsakis.** 1989. Comparison between in vivo and in vitro enzyme activities in continuous and batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**: 585-595.
- Jang, Y.-S., J. Y. Lee, J. Lee, J. H. Park, J. A. Im, M.-H. Eom, J. Lee, S.-H. Lee, H. Song, J.-H. Cho, D. Y. Seung, S. Y. Lee.** 2012. Enhanced Butanol Production Obtained by Reinforcing the Direct Butanol-Forming Route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio* **3**: e00314-12.
- Janssen, H., C. Döring, A. Ehrenreich, B. Voigt, M. Hecker, H. Bahl, R.-J. Fischer.** 2010. A proteomic and transcriptional view of acidogenic and solventogenic steady-state cells of *Clostridium acetobutylicum* in a chemostat culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 2209-2226.

- Janssen, H., C. Grimmeler, A. Ehrenreich, H. Bahl, R.-J. Fischer.** 2012. A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of *Clostridium acetobutylicum*-solvent stress caused by a transient *n*-butanol pulse. *Journal of Biotechnology* **161**: 354-365.
- Jentzsch, K., A. Wirtz, F. Circolone, T. Drepper, A. Losi, W. Gärtner, K.-E. Jaeger, U. Krauss.** 2009. Mutual Exchange of Kinetic Properties by Extended Mutagenesis in Two Short LOV Domain Proteins from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **48**: 10321-1033.
- Johnson, J. L., J. Toth, S. Santiwatanakul, J. S. Chen.** 1997. Cultures of "*Clostridium acetobutylicum*" from Various Collections Comprise *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, and Two Other Distinct Types Based on DNA-DNA Reassociation. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 420-424.
- Jones, S. W., C. J. Paredes, B. Tracy, N. Cheng, R. Sillers, R. S. Senger, E. T. Papoutsakis.** 2008. The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biology* **9**: R114.
- Jones, D. T., D. R. Woods.** 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews* **50**: 484-524.
- Junelles, A. M., R. Janati-Idrissi, H. Petitdemange, R. Gay.** 1988. Iron Effect on Acetone-Butanol Fermentation. *Current Microbiology* **17**: 299-303.
- Keiler, K. C., P. R. H. Waller, R. T. Sauer.** 1996. Role of a Peptide Tagging System in Degradation of Proteins Synthesized from Damaged Messenger RNA. *Science* **271**: 990-993.
- Kim, B. H., P. Bellows, R. Datta, J. G. Zeikus.** 1984. Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 764-770.
- Kim, B. H., J. G. Zeikus.** 1985. Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutylicum*. *Developments in Industrial Microbiology* **26**: 1-14.
- Kuit, W., N. P. Minton, A. M. López-Contreras, G. Eggink.** 2012. Disruption of the acetate kinase (*ack*) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**: 729-741.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larsson, J. T., A. Rogstam, C. von Wachenfeldt.** 2005. Coordinated patterns of cytochrome *bd* and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**: 3323-3335.

- Lehmann, D.** 2012. Neue Einblicke in den Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.
- Lehmann, D., D. Hönicke, A. Ehrenreich, M. Schmidt, D. Weuster-Botz, H. Bahl, T. Lütke-Eversloh.** 2012a. Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: Physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**: 743-754.
- Lehmann, D., T. Lütke-Eversloh.** 2011. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metabolic Engineering* **13**: 464-473.
- Lehmann, D., N. Radomski, T. Lütke-Eversloh.** 2012b. New insights into the butyric acid metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**: 1325-1339.
- Lütke-Eversloh, T., H. Bahl.** 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 634-647.
- Mann, M. S., Z. Dragovic, G. Schirmacher, T. Lütke-Eversloh.** 2012. Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnology Letters* **34**: 1643-1649.
- Mann, M. S., T. Lütke-Eversloh.** 2012. Thiolase Engineering for Enhanced Butanol Production in *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering*. DOI:10.1002/bit.24758
- Matsushita, C., O. Matsushita, M. Koyama, A. Okabe.** 1994. A *Clostridium perfringens* Vector for the Selection of Promoters. *Plasmid* **31**: 317-319.
- Matz, M. V, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov.** 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology* **17**: 969-973.
- Mermelstein, L D, E. T. Papoutsakis.** 1993. In Vivo Methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* Phage ϕ 3T I Methyltransferase To Protect Plasmids from Restriction upon Transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1077-1081.
- Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett, E. T. Papoutsakis.** 1992. Expression of Cloned Homologous Fermentative Genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technology* **10**: 190-195.
- Meyer, C. L., J. K. McLaughlin, E. T. Papoutsakis.** 1985. The effect of CO on growth and product formation in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* **7**: 37-42.

- Meyer, C. L., J. W. Roos, E. T. Papoutsakis.** 1986. Carbon monoxide gasing leads to alcohol production and butyrate uptake without acetone formation in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **24**: 159-167.
- Monot, F., J.-R. Martin, H. Petitdemange, R. Gay.** 1982. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 1318-1324.
- Morita, R., S. Nakane, A. Shimada, M. Inoue, H. Iino, T. Wakamatsu, K. Fukui, N. Nakagawa, R. Masui, S. Kuramitsu.** 2010. Molecular Mechanisms of the Whole DNA Repair System: A Comparison of Bacterial and Eukaryotic Systems. *Journal of Nucleic Acids*. DOI:10.4061/2010/179594
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt.** 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.
- Nuyts, S., L. van Mellaert, J. Theys, W. Landuyt, P. Lambin, J. Anné.** 2001. The Use of Radiation-Induced Bacterial Promoters in Anaerobic Conditions: A Means to Control Gene Expression in *Clostridium*-Mediated Therapy for Cancer. *Radiation Research* **155**: 716-723.
- Nölling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin, D. R. Smith.** 2001. Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* **183**: 4823-4838.
- Oultram, J. D., M. Loughlin, T.-J. Swinfield, J. K. Brehm, D. E. Thompson, N. P. Minton.** 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters* **56**: 83-88.
- Paredes, C. J., R. S. Senger, I. S. Spath, J. R. Borden, R. Sillers, E. T. Papoutsakis.** 2007. A General Framework for Designing and Validating Oligomer-Based DNA Microarrays and Its Application to *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4631-4638.
- Peguín, S., G. Goma, P. Delorme, P. Soucaille.** 1994. Metabolic flexibility of *Clostridium acetobutylicum* in response to methyl viologen addition. *Applied Microbiology and Biotechnology* **42**: 611-616.
- Petersen, D. J., G. N. Bennett.** 1990. Purification of Acetoacetate Decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Cloning of the Acetoacetate Decarboxylase Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 3491-3498.

- Petersen, D. J., G. N. Bennett.** 1991. Cloning of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Acetyl Coenzyme A Acetyltransferase (Thiolase; EC 2.3.1.9) Gene. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2735-2741.
- Phillips-Jones, M. K.** 1993. Bioluminescence (*lux*) expression in the anaerobe *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters* **106**: 265-270.
- Phillips-Jones, M. K.** 2000. Use of a *lux* reporter system for monitoring rapid changes in α -toxin gene expression in *Clostridium perfringens* during growth. *FEMS Microbiology Letters* **188**: 29-33.
- Potzkei, J., M. Kunze, T. Drepper, T. Gensch, K.-E. Jaeger, J. Büchs.** 2012. Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor. *BMC Biology* **10**: 28.
- Quixley, K. W., S. J. Reid.** 2000. Construction of a Reporter Gene Vector for *Clostridium beijerinckii* using a *Clostridium* Endoglucanase Gene. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**: 53-57.
- Rao, G., R. Mutharasan.** 1987. Altered Electron Flow in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum* Induced by Viologen Dyes. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1232-1235.
- Ravagnani, A., K. C. B. Jennert, E. Steiner, R. Grünberg, J. R. Jefferies, S. R. Wilkinson, D. I. Young, E. C. Tidswell, D. P. Brown, P. Youngman, J. G. Morris, M. Young.** 2000. Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia. *Molecular Microbiology* **37**: 1172-1185.
- Reents, H., R. Münch, T. Dammeyer, D. Jahn, E. Härtig.** 2006. The Fnr Regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **188**: 1103-1112.
- Riebe, O.** 2009. Enzyme und Reaktionswege zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.
- Roos, J. W., J. K. McLaughlin, E. T. Papoutsakis.** 1985. The Effect of pH on Nitrogen Supply, Cell Lysis, and Solvent Production in Fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering* **27**: 681-694.
- Sambrook, J., D. W. Russel.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Santangelo, J. D., P. Dürre, D. R. Woods.** 1995. Characterization and expression of the hydrogenase-encoding gene from *Clostridium acetobutylicum* P262. *Microbiology* **141**: 171-180.
- Schaffer, S., N. Isci, B. Zickner, P. Dürre.** 2002. Changes in protein synthesis and identification of proteins specifically induced during solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Electrophoresis* **23**: 110-121.

- Schau, M., Y. Chen, F. Hulett.** 2004. *Bacillus subtilis* YdiH Is a Direct Negative Regulator of the *cydABCD* Operon. *Journal of Bacteriology* **186**: 4585-4595.
- Scheel, M.** 2012. Entwicklung und Anwendung eines Hochdurchsatz-Screenings zur Optimierung der biotechnologischen Butanolproduktion. Dissertation. Universität Rostock.
- Schulz, F.** 2009. Charakterisierung von anaeroben Fluoreszenzproteinen in *Clostridium acetobutylicum*. Diplomarbeit. Universität Rostock.
- Schwarz, K. M., W. Kuit, C. Grimmler, A. Ehrenreich, S. W. M. Kengen.** 2012. A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of *Clostridium acetobutylicum*-Cellular behavior in adaptation to *n*-butanol. *Journal of Biotechnology* **161**: 366-377.
- Scotcher, M. C., K.-x. Huang, M. L. Harrison, F. B. Rudolph, G. N. Bennett.** 2003. Sequences affecting the regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **30**: 414-420.
- Shao, L., S. Hu, Y. Yang, Y. Gu, J. Chen, Y. Yang, W. Jiang, S. Yang.** 2007. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. *Cell Research* **17**: 963-965.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, Y. Saiga.** 1962. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**: 223-239.
- Sickmier, E. A., D. Brekasis, S. Paranawithana, J. B. Bonanno, M. S. B. Paget, S. K. Burley, C. L. Kielkopf.** 2005. X-Ray Structure of a Rex-Family Repressor/NADH Complex Insights into the Mechanism of Redox Sensing. *Structure* **13**: 43-54.
- Sillers, R., M. A. Al-Hinai, E. T. Papoutsakis.** 2009. Aldehyde-Alcohol Dehydrogenase and/or Thiolase Overexpression Coupled With CoA Transferase Downregulation Lead to Higher Alcohol Titters and Selectivity in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* **102**: 38-49.
- Southward, C. M., M. G. Surette.** 2002. The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. *Molecular Microbiology* **45**: 1191-1196.
- Stretton, S., S. Techkarnjanaruk, A. M. McLennan, A. E. Goodman.** 1998. Use of Green Fluorescent Protein To Tag and Investigate Gene Expression in Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2554-2559.
- Sui, Y., Z. Wu.** 2007. Alternative Statistical Parameter for High-Throughput Screening Assay Quality Assessment. *Journal of Biomolecular Screening* **12**: 229-234.

- Sullivan, L., G. N. Bennett.** 2006. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Spo0A strain variants. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **33**: 298-308.
- Swartz, T. E., S. B. Corchnoy, J. M. Christie, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs, R. A. Bogomolni.** 2001. The Photocycle of a Flavin-binding Domain of the Blue Light Photoreceptor Phototropin. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 36493-36500.
- Terpe, K.** 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**: 211-222.
- Thormann, K., L. Feustel, K. Lorenz, S. Nakotte, P. Dürre.** 2002. Control of Butanol Formation in *Clostridium acetobutylicum* by Transcriptional Activation. *Journal of Bacteriology* **184**: 1966-1973.
- Tielker, D., I. Eichhof, K.-E. Jaeger, J. F. Ernst.** 2009. Flavin Mononucleotide-Based Fluorescent Protein as an Oxygen-Independent Reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **8**: 913-915.
- Tomas, C. A., K. V. Alsaker, H. P. J. Bonarius, W. T. Hendriksen, H. Yang, J. A. Beamish, C. J. Paredes, E. T. Papoutsakis.** 2003. DNA Array-Based Transcriptional Analysis of Asporogenous, Nonsolventogenic *Clostridium acetobutylicum* Strains SKO1 and M5. *Journal of Bacteriology* **185**: 4539-4547.
- Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354.
- Tracy, B. P., S. M. Gaida, E. T. Papoutsakis.** 2008. Development and Application of Flow-Cytometric Techniques for Analyzing and Sorting Endospore-Forming Clostridia. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 7497-7506.
- Truffaut, N., J. Hubert, G. Reysset.** 1989. Construction of shuttle vectors useful for transforming *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Letters* **58**: 15-19.
- Tsien, R. Y.** 1998. The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509-544.
- Tummala, S. B., S. G. Junne, E. T. Papoutsakis.** 2003. Antisense RNA Downregulation of Coenzyme A Transferase Combined with Alcohol-Aldehyde Dehydrogenase Overexpression Leads to Predominantly Alcoholicogenic *Clostridium acetobutylicum* Fermentations. *Journal of Bacteriology* **185**: 3644-3653.

- Tummala, S. B., N. E. Welker, E. T. Papoutsakis.** 1999. Development and Characterization of a Gene Expression Reporter System for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3793-3799.
- Ushida, C., H. Himeno, T. Watanabe, A. Muto.** 1994. tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* **22**: 3392-3396.
- Vasconcelos, I., L. Girbal, P. Soucaille.** 1994. Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Grown in Chemostat Culture at Neutral pH on Mixtures of Glucose and Glycerol. *Journal of Bacteriology* **176**: 1443-1450.
- Walter, K. A., R. V. Nair, J. W. Cary, G. N. Bennett, E. T. Papoutsakis.** 1993. Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **134**: 107-111.
- Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph, E. T. Papoutsakis.** 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2717-2722.
- Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph, E. T. Papoutsakis.** 1989. Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in Acidogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 317-322.
- Wietzke, M., H. Bahl.** 2012. The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**: 749-761.
- Winzer, K., K. Lorenz, B. Zickner, P. Dürre.** 2000. Differential Regulation of Two Thiolase Genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**: 531-541.
- Woods, D. R.** 1995. The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends in Biotechnology* **13**: 259-264.
- Zhao, Y., C. A. Tomas, F. B. Rudolph, E. T. Papoutsakis, G. N. Bennett.** 2005. Intracellular Butyryl Phosphate and Acetyl Phosphate Concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and Their Implications for Solvent Formation. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 530-537.

7. Anhang

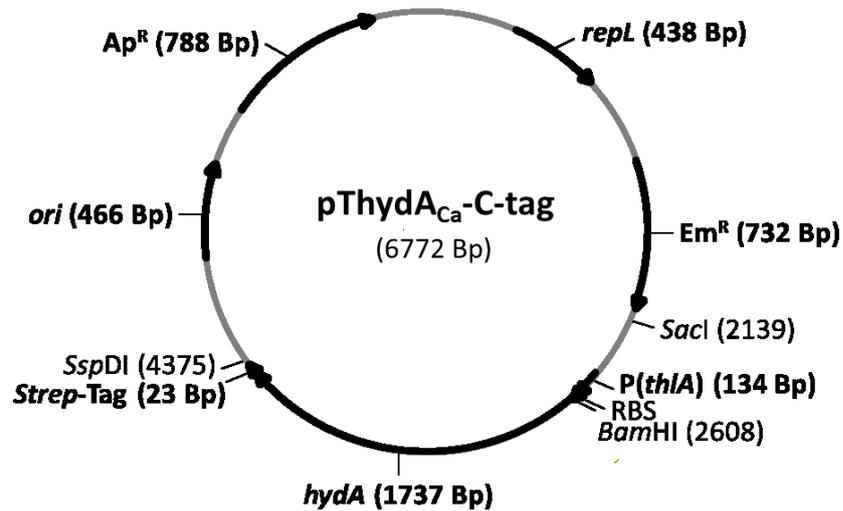


Abb. A.1: Vektorkarte pThyA_{Ca}-C-tag. Der Expressionsvektor enthält den clostridiellen Thiolasegen-Promotor (*P(thlA)*), Ampicillin- und Erythromycin-Resistenzen (*Ap^R*, *Em^R*), Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*repl*, *ori*), das *hydA*-Gen aus *C. acetobutylicum*, sowie einen *Strep*-Tag am C-Terminus des HydA (Girbal *et al.*, 2005). Die Restriktionsschnittstellen *SacI*, *BamHI* und *SspDI* waren für die Klonierungen von Bedeutung.

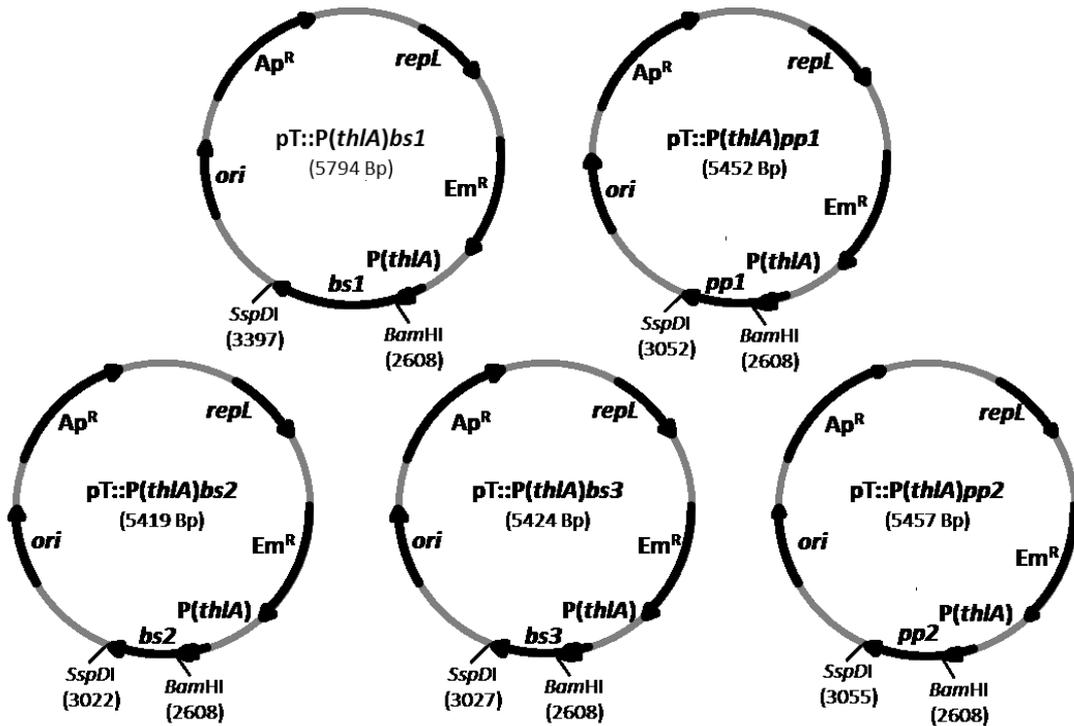


Abb. A.2: pT-Plasmide mit unterschiedlichen FbFP-Genen. Die Plasmide basieren auf dem pThyA_{Ca}-C-tag-Vektor (Girbal *et al.*, 2005). Durch *Bam*HI/*Ssp*DI-spezifische Restriktion wurden das *hydA*-Gen und der *Strep*-Tag entfernt und unterschiedliche FbFP-Gene (*bs1*, 782 Bp; *bs2*, 411 Bp; *bs3*, 411 Bp; *pp1*, 444 Bp; *pp2*, 444 Bp) inseriert. Die Plasmide besitzen den clostridiellen Thiolasegen-Promotor (*P(thlA)*), Ampicillin- und Erythromycin-Resistenzen (*Ap*^R, *Em*^R) und Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*repl*, *ori*). Die Plasmide pT::P(*thlA*)*bs1*, pT::P(*thlA*)*bs3* und pT::P(*thlA*)*pp2* stammen aus einer früheren Arbeit (Schulz, 2009).

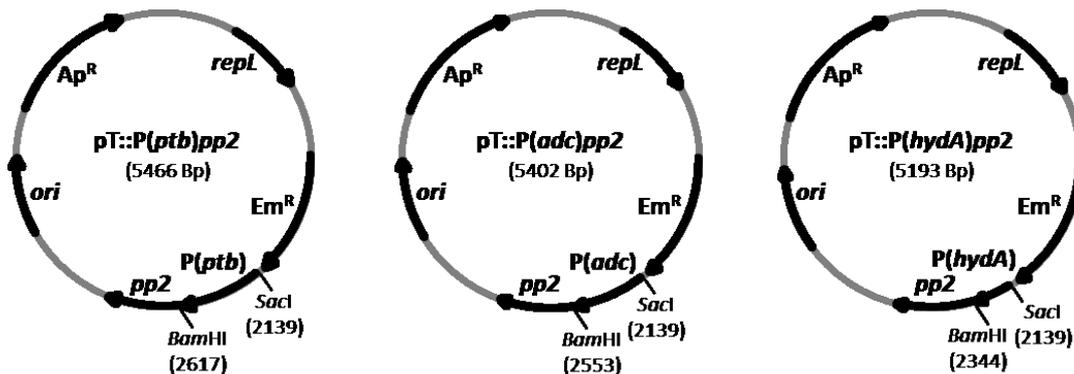


Abb. A.3: Plasmide zur *ptb*-, *adc*- bzw. *hydA*-Promotorstudie mittels *pp2*-Reporter. Die Plasmide basieren auf dem pT::P(*thlA*)*pp2*-Vektor (Schulz, 2009). Durch *Sac*I/*Bam*HI-spezifische Restriktion wurde der Thiolasegen-Promotor entfernt und gegen den Phosphotransbutyrylasegen-Promotoren (*P(ptb)*, 472 Bp), den Acetoacetat-Decarboxylasegen-Promotor (*P(adc)*, 408 Bp) bzw. den Hydrogenasegen-Promotor (*P(hydA)*, 199 Bp) ersetzt. Die Plasmide besitzen das *pp2*-Fluoreszenzreportergen, Ampicillin- und Erythromycin-Resistenzen (*Ap*^R, *Em*^R) und Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*repl*, *ori*).

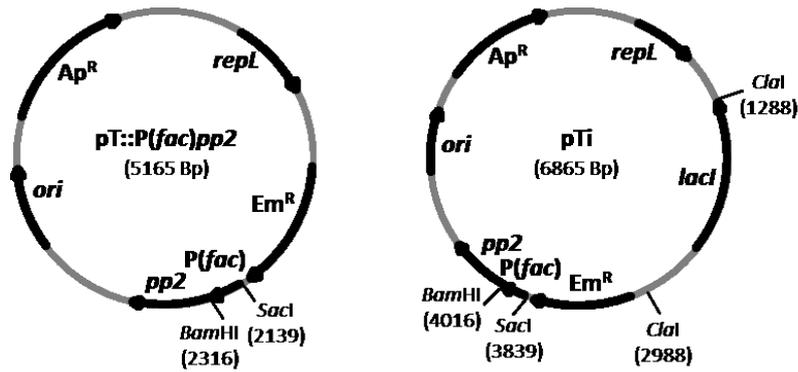


Abb. A.4: Vektorkarte pT::P(fac)pp2 und pTi (induzierbares Expressionsplasmid). Die Plasmide basieren auf dem pT::P(*thIA*)pp2-Vektor (Schulz, 2009). Durch *Sac*I/*Bam*HI-spezifische Restriktion wurde der Thiolasegen-Promotor entfernt und gegen den artifiziiellen *fac*-Promotor (*P(fac)*, 171 Bp) ersetzt (pT::P(*fac*)pp2). Zudem wurde durch Insertion des *lacI*-Gens (1694 Bp) in das pT::P(*fac*)pp2-Plasmid (*Clal*-Restriktion) das induzierbare pTi-Plasmid generiert. Die Plasmide besitzen das *pp2*-Fluoreszenzreportergen, Ampicillin- und Erythromycin-Resistenzen (*Ap^R*, *Em^R*) und Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*repl*, *ori*).

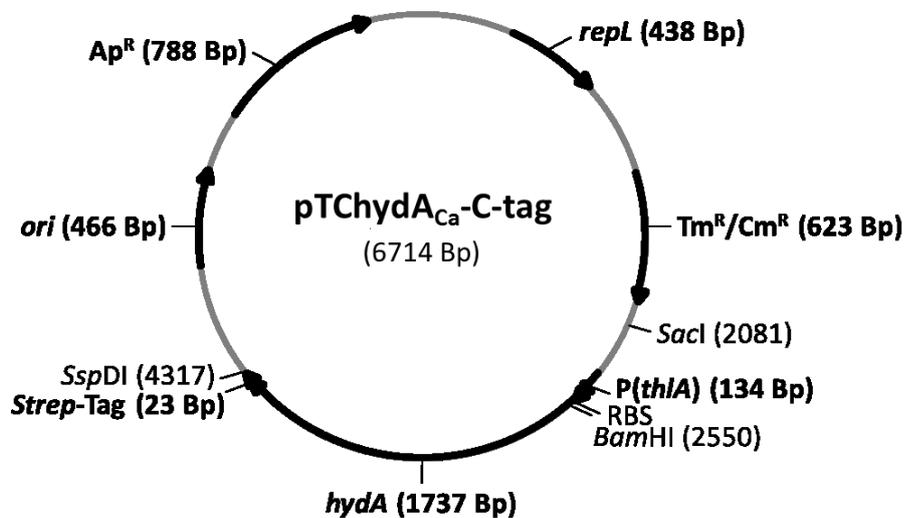


Abb. A.5: Vektorkarte pTChydA_{Ca}-C-tag. Der Expressionsvektor enthält den clostridiellen Thiolasegen-Promotor (*P(thIA)*), Ampicillin- und Thiamphenicol-/ Chloramphenicol-Resistenzen (*Ap^R*, *Tm^R/Cm^R*), Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*repl*, *ori*), das *hydA*-Gen aus *C. acetobutylicum*, sowie einen *Strep*-Tag am C-Terminus des HydA. Die Restriktionsschnittstellen *Sac*I, *Bam*HI und *Ssp*DI waren für die Klonierungen von Bedeutung.

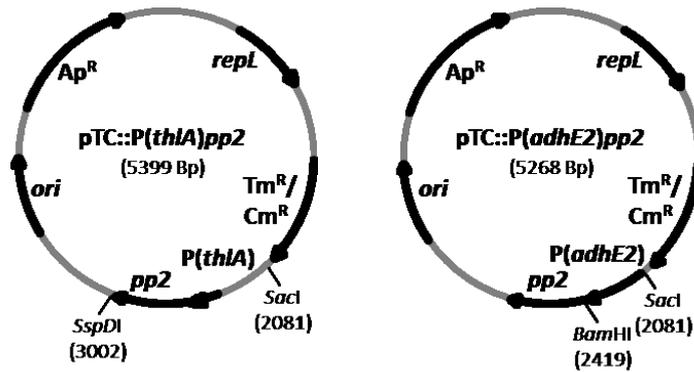


Abb. A.6: Plasmide zur *thIA*- bzw. *adhE2*-Promotorstudie in *C. acetobutylicum* Integrationsstämmen. Die Plasmide basieren auf dem pThyA_{Ca}-C-Tag-Vektor. Durch *SacI*/*SspDI*-spezifische Restriktion wurden das *hydA*-Gen und der *Strep*-Tag entfernt und der Thiolasegen-Promotor (*P(thIA)*) zusammen mit dem *pp2*-Reportergen (915 Bp) eingefügt (*pTC::P(thIA)pp2*). Anschließend erfolgte die Insertion des Aldehyd/ Alkohol-Dehydrogenasegen-Promotors (*P(adhE2)*, 332 Bp) in das *pTC::P(thIA)pp2*-Plasmid (*SacI*/*BamHI*-Restriktion; *pTC::P(adhE2)pp2*). Die Plasmide besitzen Ampicillin- und Thiamphenicol-/ Chloramphenicol-Resistenzen (*Ap^R*, *Tm^R/Cm^R*) und Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*repl*, *ori*).

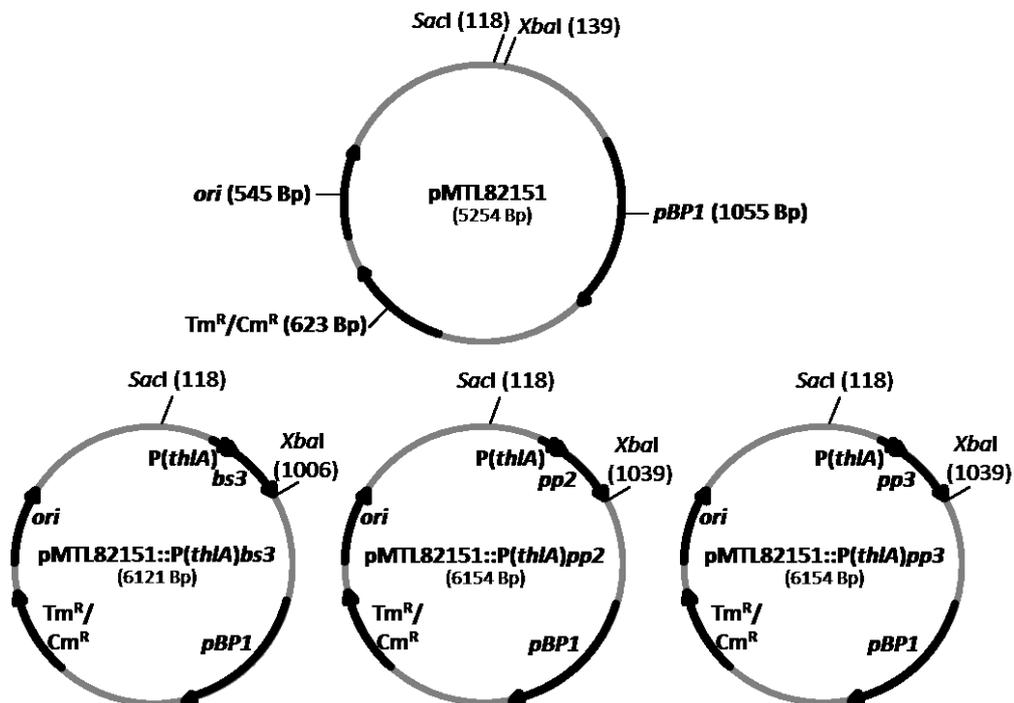


Abb. A.7: Vektorkarten pMTL82151-Serie. Die Plasmide basieren auf dem pMTL82151-Vektor (Heap *et al.*, 2009). Durch *SacI*/*XbaI*-spezifische Restriktion wurden der Thiolasegen-Promotor (*P(thIA)*) zusammen mit unterschiedlichen FbFP-Genen (*bs3*, 882 Bp; *pp2*, 915 Bp; *pp3*, 915 Bp) eingefügt. Die Plasmide besitzen Thiamphenicol-/ Chloramphenicol-Resistenzen (*Tm^R/Cm^R*) und Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*pBP1*, *ori*).

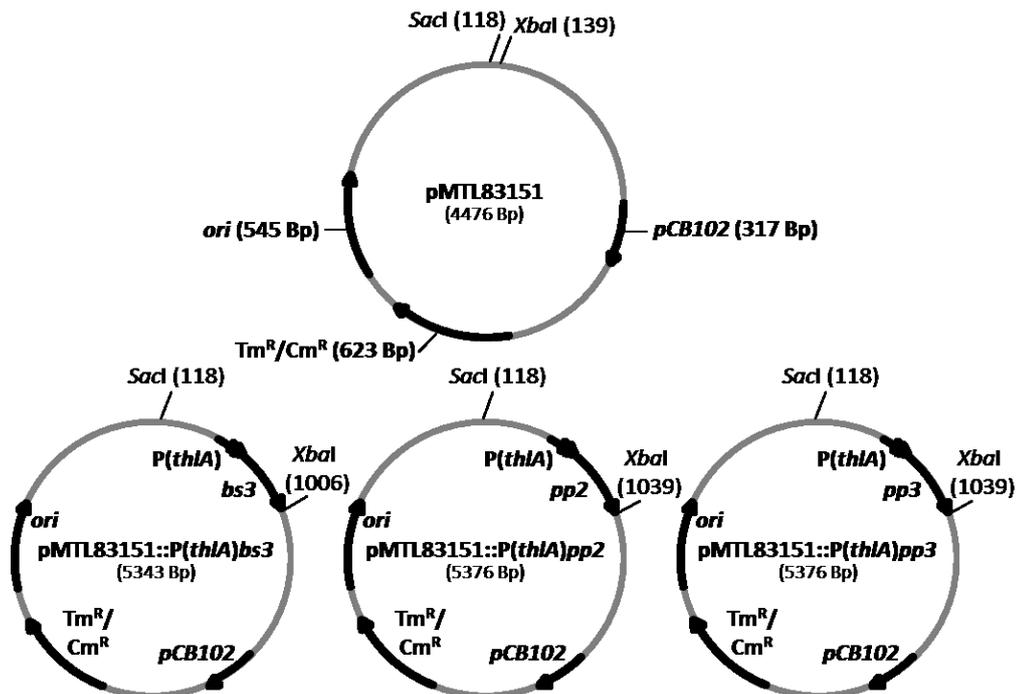


Abb. A.8: Vektorkarten pMTL83151-Serie. Die Plasmide basieren auf dem pMTL83151-Vektor (Heap *et al.*, 2009). Durch *SacI*/*XbaI*-spezifische Restriktion wurden der Thiolasegen-Promotor (*P(thlA)*) zusammen mit unterschiedlichen FbFP-Genen (*bs3*, 882 Bp; *pp2*, 915 Bp; *pp3*, 915 Bp) eingefügt. Die Plasmide besitzen Thiamphenicol-/ Chloramphenicol-Resistenzen (Tm^R/Cm^R) und Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*pCB102*, *ori*).

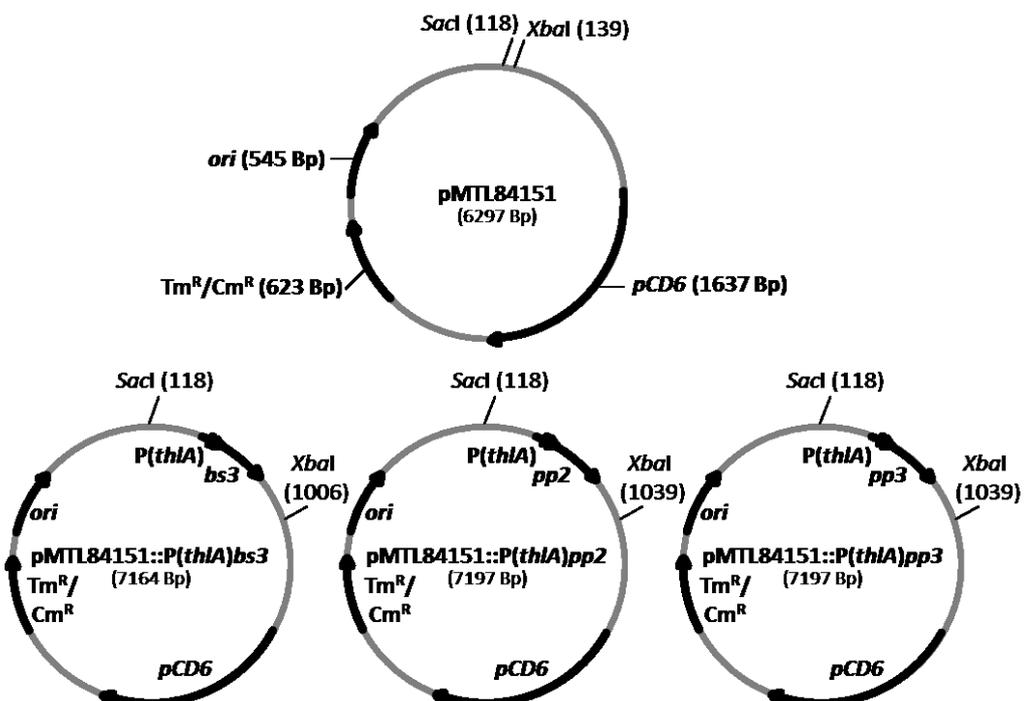


Abb. A.9: Vektorkarten pMTL84151-Serie. Die Fortsetzung der Legende befindet sich auf der Folgeseite.

Abb. A.9: Fortsetzung: Vektorkarten pMTL84151-Serie. Die Plasmide basieren auf dem pMTL84151-Vektor (Heap *et al.*, 2009). Durch *SacI*/*XbaI*-spezifische Restriktion wurden der Thiolasegen-Promotor (*P(thlA)*) zusammen mit unterschiedlichen FbFP-Genen (*bs3*, 882 Bp; *pp2*, 915 Bp; *pp3*, 915 Bp) eingefügt. Die Plasmide besitzen Thiamphenicol-/ Chloramphenicol-Resistenzen (Tm^R / Cm^R) und Replikationsursprünge in Gram-positiven/-negativen Bakterien (*pCD6*, *ori*).

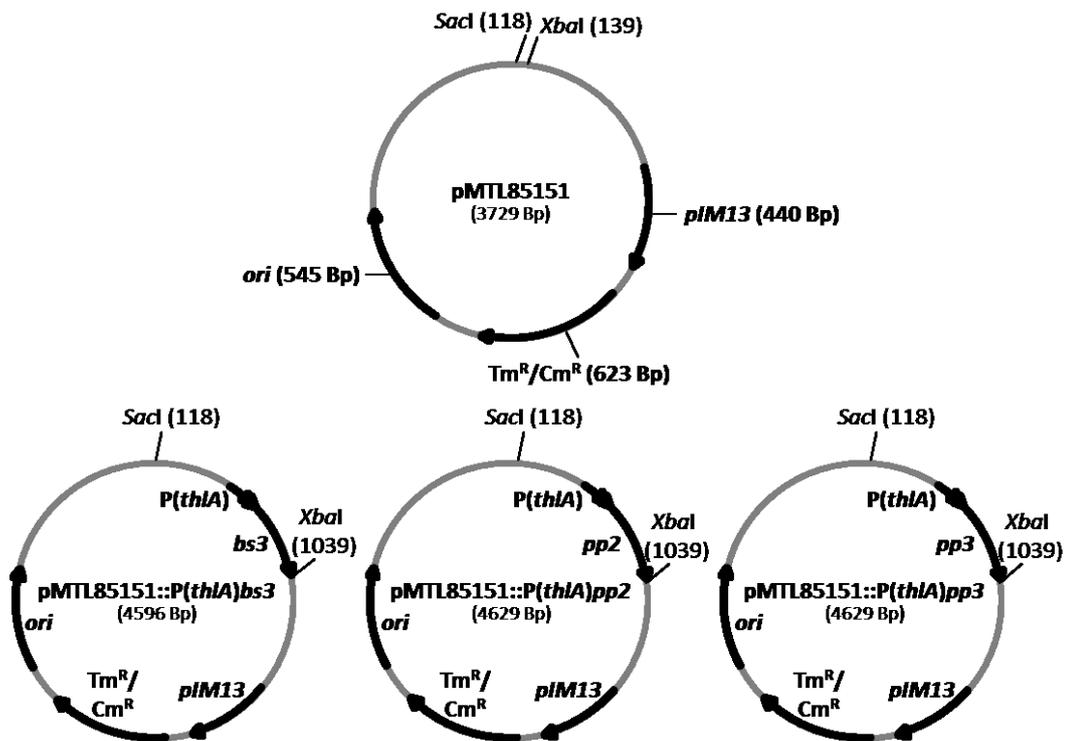


Abb. A.10: Vektorkarten pMTL85151-Serie. Die Plasmide basieren auf dem pMTL85151-Vektor (Heap *et al.*, 2009). Durch *SacI*/*XbaI*-spezifische Restriktion wurden der Thiolasegen-Promotor (*P(thlA)*) zusammen mit unterschiedlichen FbFP-Genen (*bs3*, 882 Bp; *pp2*, 915 Bp; *pp3*, 915 Bp) eingefügt. Die Plasmide besitzen Thiamphenicol-/ Chloramphenicol-Resistenzen (Tm^R / Cm^R) und Replikationsursprünge in Gram-positiven/ -negativen Bakterien (*pIM13*, *ori*).

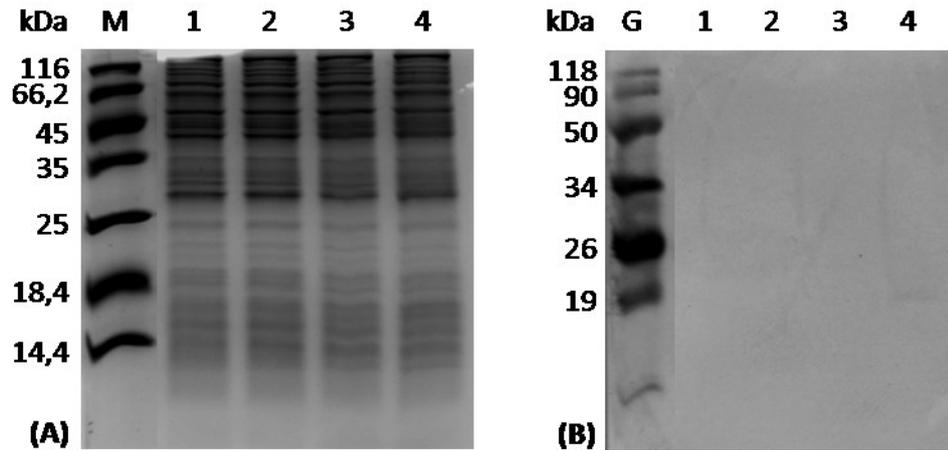


Abb. A.11: Expression von Bs1, Bs2 und Bs3 in *C. acetobutylicum*. Dargestellt sind eine 15 %ige SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung (A) und der resultierende Western Blot nach der Detektion (B). Rekombinante Bs-Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert und durch NBT/BCIP-Färbung visualisiert. Es wurden ca. 5 μ g bzw. 10 μ g Gesamtproteinextrakt (A bzw. B) aufgetragen. **M** Unstained Protein Molecular Weight Marker; **G** Prestained Protein Molecular Weight Marker; **1** pT-Kontrolle; **2** pT::P(*thIA*)*bs1*; **3** pT::P(*thIA*)*bs2*; **4** pT::P(*thIA*)*bs3*.

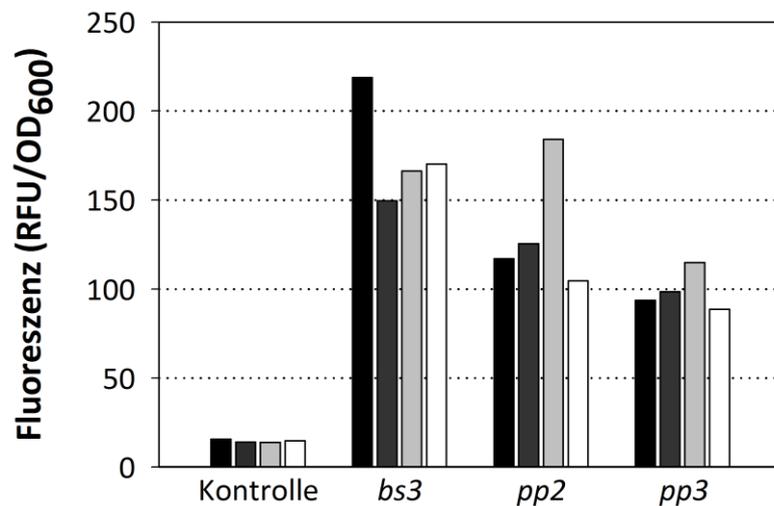


Abb. A.12: Fluoreszenzmessungen rekombinanter *E. coli*-Stämme mit Plasmiden der pMTL80000-Serie. Die rekombinanten Stämme wurden aerob bei 37 °C in 5 ml LB-Medium (45 μ g/ml Chloramphenicol) angezogen. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). FbFP (*bs3*, *pp2*, *pp3*)-vermittelte Fluoreszenz. pMTL82151 (schwarz); pMTL83151 (dunkelgrau); pMTL84151 (hellgrau); pMTL85151 (weiß). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm. n=1.

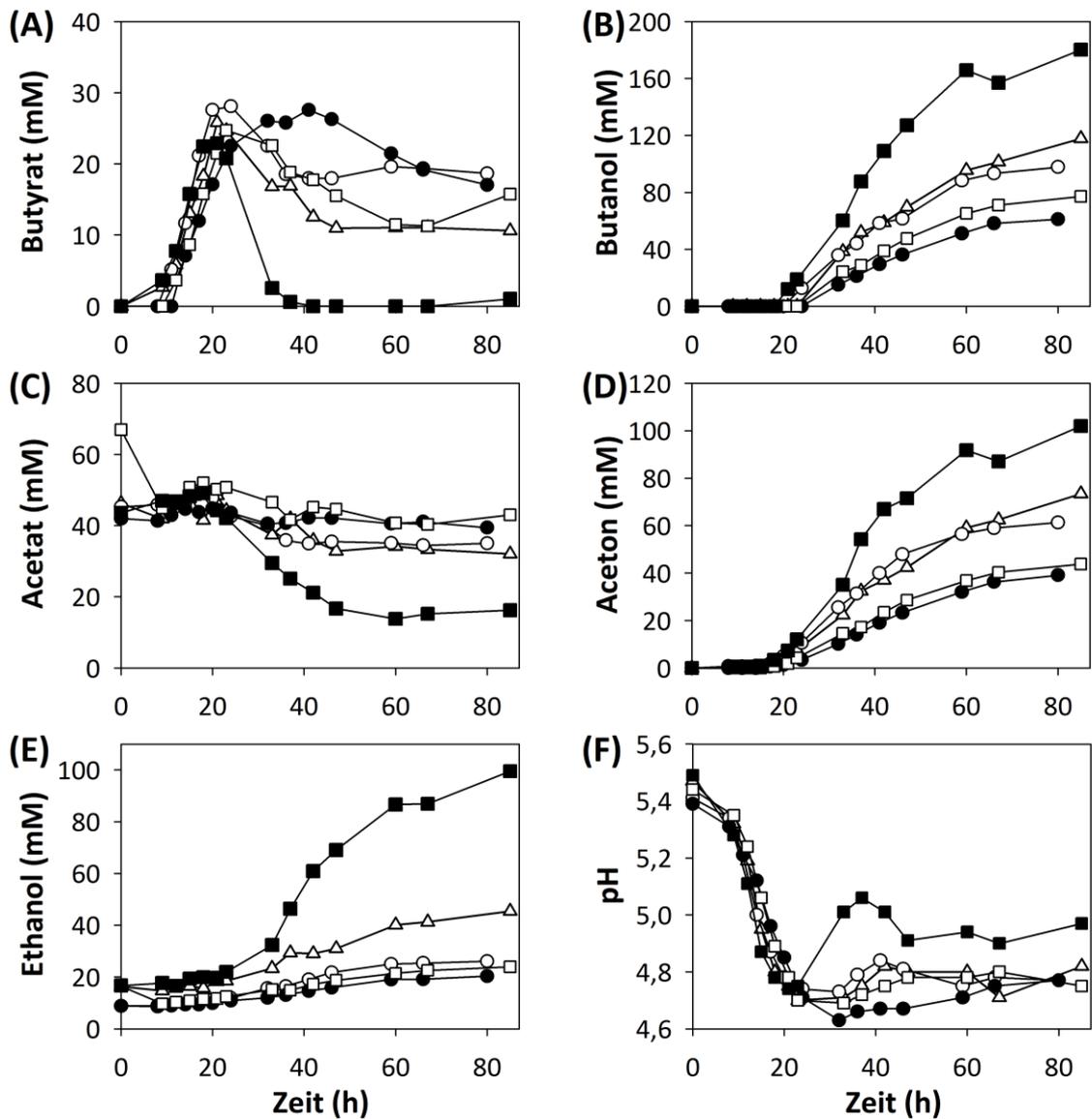


Abb. A.13: Produktspektren rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 200 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 20 µg/ml Erythromycin angezogen. Es sind repräsentative Daten von mindestens zwei Replikaten dargestellt. Δ pT-Kontrolle; \circ pT::P(*thIA*)pp2; \bullet pT::P(*ptb*)pp2; \square pT::P(*adc*)pp2; \blacksquare pT::P(*hydA*)pp2.

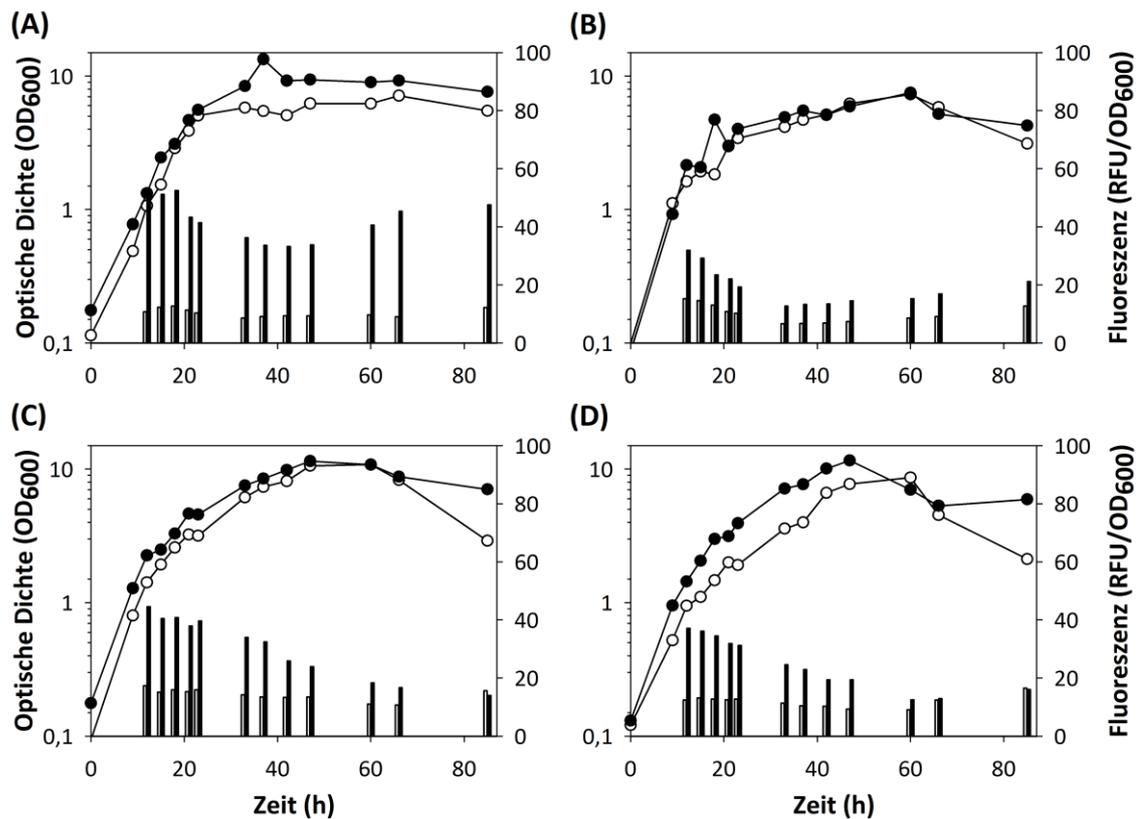


Abb. A.14: In vivo Analyse der *thIA*-Promotoraktivität im *C. acetobutylicum* Wildtyp (A), *rex::int(95)* (B), *ptb::int(87)* (C) und *hbd::int(69)* (D). Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 200 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 15 µg/ml Thiamphenicol angezogen. Das Wachstum wurde durch Messung der Optischen Dichte (OD_{600}) verfolgt. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). ○ OD_{600} pTC-Kontrolle; □ RFU pTC-Kontrolle; ● OD_{600} pTC::P(*thIA*)pp2; ■ RFU pTC::P(*thIA*)pp2. $E_x=449$ nm/ $E_m=495$ nm. n=1.

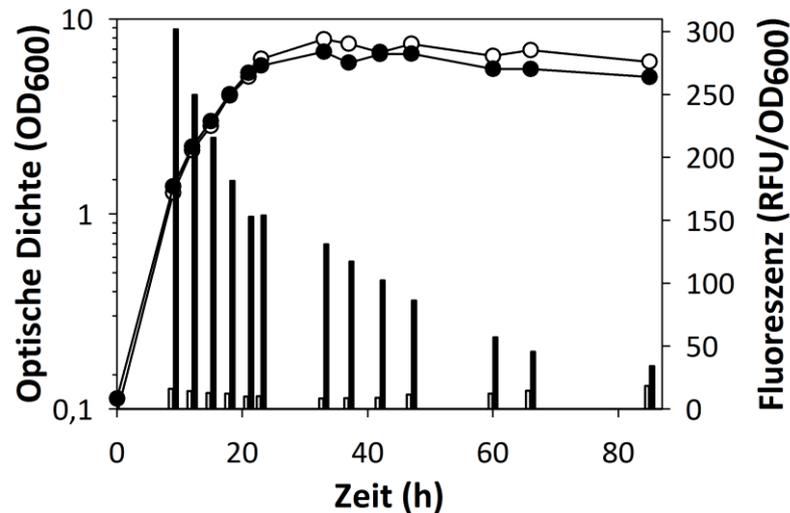


Abb. A.15: In vivo FbFP-Expression in *C. acetobutylicum* vermittelt durch den artifizialen *fac*-Promotor. Die rekombinanten Stämme wurden anaerob bei 37 °C in 200 ml Minimalmedium (MS-MES) mit 20 µg/ml Erythromycin angezogen. Das Wachstum wurde durch Messung der Optischen Dichte (OD₆₀₀) verfolgt. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). ○ OD₆₀₀ pT-Kontrolle; □ RFU pT-Kontrolle; ● OD₆₀₀ pT::P(*fac*)pp2; ■ RFU pT::P(*fac*)pp2. E_x=449 nm/E_m=495 nm. n=1.

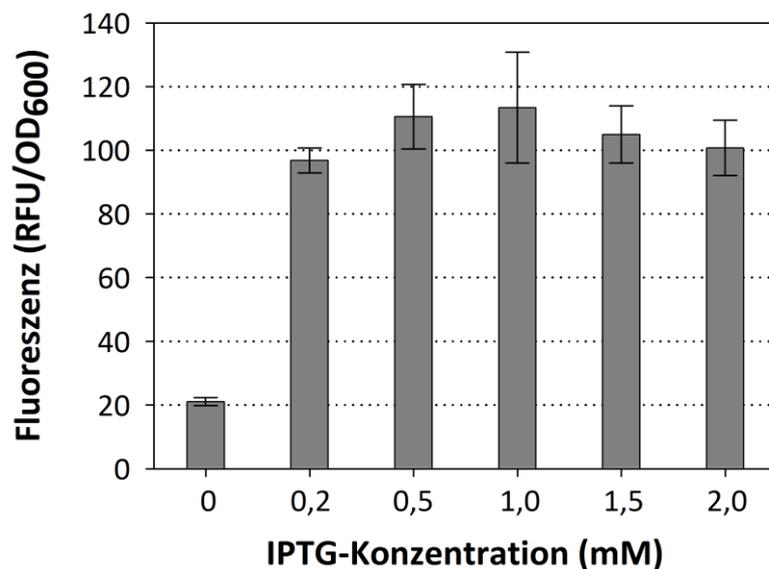


Abb. A.16: Variation der IPTG-Konzentration zur Induktion von *C. acetobutylicum* pTi. Exponentiell wachsende Zellen (10 ml MS-MES, 20 µg/ml Erythromycin) wurden durch verschiedene IPTG-Konzentrationen induziert und die Fluoreszenz nach 3 Stunden ermittelt. Die Messungen erfolgten am SpectraMaxM2^e Spektrophotometer (Molecular Devices). Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU). Optische Dichte (OD₆₀₀). E_x=449 nm/E_m=495 nm. n=3.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hubert Bahl für die Möglichkeit meine experimentellen Arbeiten in der Abteilung Mikrobiologie durchführen zu können, sowie für das entgegengebrachte Interesse während dieser Zeit.

Frau Dr. Tina Lütke-Eversloh danke ich für die Unterstützung während der Antragstellung zur Finanzierung der Arbeit, die zahlreichen Anregungen, die Möglichkeit zur selbständigen Bearbeitung dieses Themas und die Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke der Landesgraduiertenförderung Mecklenburg-Vorpommern für die Finanzierung während der experimentellen Arbeiten.

PD Dr. Rhenia Schumann (Universität Rostock) und Dr. Sascha Hausmann (evocatal GmbH, Düsseldorf) danke ich für die Unterstützung während der Fluoreszenz-mikroskopischen Dokumentation bzw. der Anfertigung der Plattenbilder unter Blaulicht. Antje Cordshagen und Stine Kögler danke ich für ihre Hilfe in Teilen dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilungen Mikrobiologie und Biochemie, insbesondere Dr. Ralf-Jörg Fischer, Hella Goschke, Dr. Antje May und Christine Voigt für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dr. Dörte Lehmann und Mandy Wietzke danke ich für die Bereitstellung der Integrationsstämme.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Michael Scheel für die Unterstützung in guten und schlechten Tagen im Labor, die verständnisvolle Art meine Probleme und Sorgen ausdiskutieren, die vielen schönen Momente im privaten Bereich und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei meinen Eltern Marita und Peter Schulz bedanke ich mich herzlichst für das entgegengebrachte Vertrauen und die aufbauenden Motivationen in dieser Zeit. Zudem danke ich Ihnen für die private Finanzierung meiner „Schreibphase“.

Selbständigkeitserklärung

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

Rostock, 25.01.2013

Franziska Schulz